

Dissertation
zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
an der Fakultät für Biologie der
Ludwig-Maximilians-Universität München



Untersuchung der strukturellen Plastizität von adult-geborenen
Neuronen und deren Synapsen im Riechkolben eines Mausmodells
der Parkinsonschen Erkrankung *in vivo*

vorgelegt von
Johanna Neuner
aus Ulm

Eidesstattliche Erklärung

Diese Dissertation wurde von Herrn Prof. Dr. Jochen Herms betreut und von Herrn Prof. Dr. George Boyan an der Fakultät für Biologie vertreten.

Sie wurde eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet. Ein Teil der in dieser Dissertation enthaltenen Abbildungen wurde in den folgenden Manuskripten veröffentlicht.

Neuner, J., Filser, S., Michalakis, S., Biel, M. & Herms, J. A30P α -Synuclein interferes with the stable integration of adult-born neurons into the olfactory network. *Sci Rep.* **3931**, 1-9 (2014).

Neuner, J., Ovsepiyan, S.V., Dorostkar, M., Filser, S., Gupta, A., Michalakis, S., Biel, M. & Herms, J. Pathological α -synuclein impairs adult-born granule cell development and functional integration in the olfactory bulb. *Nat Commun.* **3915**, 1-12 (2014).

München, den 4. März 2014

Erstgutachter: Prof. Dr. George Boyan

Zweitgutachter: Prof. Dr. Angelika Böttger

Tag der mündlichen Prüfung: 9. Juli 2014

“Once development was ended, the fonts of growth and regeneration of the axons and dendrites dried up irrevocably. In the adult centers, the nerve paths are something fixed, and immutable: everything may die, nothing may be regenerated.”

Ramón y Cajal, 1928

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Erklärung	3
Zusammenfassung.....	10
Summary.....	13
1 Einleitung.....	15
1.1 Adulte Neurogenese im Riechkolben	15
1.1.1 Geschichte	15
1.1.2 Neurogenese und Aufbau des Riechkolbens	16
1.1.3 Neuronale Plastizität im Riechkolben	18
1.1.4 Geruchsdiskriminierung und dendrodendritische Synapsen	19
1.1.5 Riechfunktion adult-geborener Neurone	21
1.1.6 Extrinsische und intrinsische Modulation der adulten Neurogenese	21
1.2. Morbus Parkinson	24
1.2.1 Die Krankheit - Klinische Symptome, Häufigkeit und Therapie	24
1.2.2 α -Synuklein - Struktur, Expression und physiologische Funktion	28
1.2.3 Rolle von α -Synuklein bei Morbus Parkinson - Proteinaggregation.....	30
1.3 Adulte Neurogenese in Mausmodellen des Morbus Parkinson	33
1.4 Strukturelle Plastizität von dendritischen Spines	35
1.5 Intravitale Untersuchungen mittels Zwei-Photonen-Mikroskopie	39
2 Ergebnisse.....	43
2.1 Charakterisierung der Pathologie im Riechkolben.....	43
2.1.1 α -Synuklein Pathologie im humanen Riechkolben	43
2.1.2 α -Synuklein Pathologie im Riechkolben von transgenen A30P α -SYN Mäusen	44
2.1.3 Testung der Geruchsdiskriminierung und des Geruchsgedächtnisses.....	47
2.2 Analyse von Untergruppen der periglomerulären Neurone in A30P α -SYN Mäusen.....	48
2.3 Quantitative Bestimmung des Überlebens von adult-geborenen Neuronen im Riechkolben von A30P α -SYN und α -SYN KO Mäusen	50
2.3.1 Periglomeruläre Neurone	52
2.3.2 Körnerzellen	53
2.4 Untersuchung der dendritischen Reifung von adult-geborenen Neuronen in A30P α -SYN und α -SYN KO Mäusen	54
2.4.1 Körnerzellen	55

2.4.2 Periglomeruläre Neurone	55
2.5 <i>In vivo</i> Analyse der neuronalen Plastizität von dopaminergen adult-geborenen Nervenzellen in A30P α -SYN Mäusen	58
2.5.1 Genetische Markierung von dopaminergen Neuronen in A30P α -SYN Mäusen.....	58
2.5.2 Kinetische Analyse des Umsatzes und des Schicksals von dopaminergen adult-geborenen Neuronen in A30P α -SYN Mäusen.....	60
2.6 <i>In vivo</i> Analyse der strukturellen Plastizität von adult-geborenen Körnerzellen in A30P α -SYN Mäusen	63
2.6.1 Spinedichte	63
2.6.2 Spineumsatz und Spinestabilität	65
2.6.3 Spinemorphologie	67
2.7 Quantitative Bestimmung von inhibitorischen Synapsen und Glutamatrezeptoren in adult-geborenen Körnerzellen von A30P α -SYN Mäusen	68
2.8 Elektrophysiologische Charakterisierung von adult-geborenen Körnerzellen	70
2.8.1 Intrinsische Eigenschaften von adult-geborenen Körnerzellen in A30P α -SYN Mäusen.....	70
2.8.2 Erregende synaptische Übertragung von Körnerzellen in A30P α -SYN Mäusen.....	72
2.9. Pharmakologische Hemmung der A30P α -SYN-induzierten Effekte auf adult-geborene Neurone	73
3 Diskussion.....	76
3.1. Intravitale Zwei-Photonen-Mikroskopie des Riechkolbens	76
3.2 Verminderte Plastizität durch instabile Integration und vermehrtes Absterben von adult-geborenen Neuronen im Riechkolben.....	77
3.3 Unvollständige dendritische Ausreifung und reduzierte Spineplastizität in A30P α -SYN Mäusen	82
3.4 Auswirkungen auf die synaptische Physiologie und die Kodierung von olfaktorischen Inputs.....	86
3.5 Therapieeffekte einer Behandlung mit der anti-aggregativen Substanz Anle138b	85
3.6 Zusammenhänge zwischen den pathologischen Veränderungen in der Reifung und Integration adult-geborener Neurone und den Riechstörungen.....	90
3.7 Schlussfolgerungen für die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen .	93
4 Materialien und Methoden	97

4.1 Mausexperimente	97
4.1.1 Mauslinien	97
4.1.2 Maushaltung.....	100
4.1.3 Implantation eines kranialen Fensters für die Intravitalmikroskopie	101
4.1.4 Injektion lentiviraler Vektoren zur Markierung von adult-geborenen Neuronen	103
4.1.5 Intravitale Zwei-Photonen-Mikroskopie	106
4.1.6 Geruchstests	109
4.1.7 Elektrophysiologie	111
4.1.8 BrdU-Injektionen.....	112
4.1.9 Perfusion und Fixierung von Gehirngewebe	113
4.2 Immunhistochemische Methoden.....	113
4.2.1 Immunhistochemische Färbung von Gehirnschnitten	113
4.2.2 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie	115
4.2.3 Antikörper.....	115
4.3 Molekularbiologische Methoden.....	116
4.3.1 DNA-Präparation aus Mausschwanzbiopsien.....	116
4.3.2 Genotypisierung der Mauslinien mittels PCR.....	116
4.3.3 Präparation lentiviraler Vektoren	117
4.4 Computergestützte Datenauswertungen	117
4.4.1 Auswertung von Nervenzell- und Spineumsatz.....	117
4.4.2 Analyse der Spinemorphologie.....	118
4.4.3 Bestimmung der Kolokalisation von Synapsen- und Rezeptorenbestandteilen in virus-markierten Dendriten	119
4.4.4 Rekonstruktion und Analyse der dendritischen Morphologie.....	119
4.4.5 Volumenmessung zur Quantifizierung von Gliose	120
4.4.6 Bildverarbeitung	120
4.4.7 Statistische Auswertungen	120
4.5 Labormaterialien und Lösungen.....	121
Literatur	124
Abkürzungen	149
Eigene Veröffentlichungen	154
Poster	154
Vorträge.....	155
Danksagung.....	156

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Adulte Neurogenese im Riechkolben.....	17
Abbildung 1.2: Zellzusammensetzung der periglomerulären Schicht in der Maus.	18
Abbildung 1.3: Dendrodendritische Synapsen und ihre Funktion im Riechkolben.	23
Abbildung 1.4: Pathologische Kennzeichen des Morbus Parkinson.	26
Abbildung 1.5: Sequenz, Struktur und postulierte Funktion des α -SYN Proteins an der Präsynapse.....	29
Abbildung 1.6: Proteinfehlfaltung, Aggregation und Toxizität.....	31
Abbildung 1.7: Adulte Neurogenese in Mausmodellen des Morbus Parkinson.	34
Abbildung 1.8: Strukturelle Plastizität von dendritischen Spines.....	38
Abbildung 2.1: α -Synuklein Pathologie im humanen Riechkolben.	44
Abbildung 2.2: Charakterisierung der Pathologie im Riechkolben von transgenen A30P α -SYN Mäusen.	46
Abbildung 2.3: Expression von humanem A30P α -SYN in adult-geborenen Neuronen.	47
Abbildung 2.4: Erhöhte Anfälligkeit von dopaminergen Neuronen in A30P α -SYN Mäusen.....	49
Abbildung 2.5: Unveränderte Zellproliferation in A30P α -SYN Mäusen.	51
Abbildung 2.6: Vermindertes Überleben von adult-geborenen periglomerulären Neuronen in A30P α -SYN Mäusen.....	52
Abbildung 2.7: Verringertes Überleben von adult-geborenen Körnerzellen in A30P α -SYN Mäusen.	55
Abbildung 2.8: Unvollständige dendritische Reifung von adult-geborenen Körnerzellen in A30P α -SYN Mäusen.	56
Abbildung 2.9: Unvollständige dendritische Entwicklung von adult-geborenen periglomerulären Neuronen in A30P α -SYN Mäusen <i>in vivo</i>	57
Abbildung 2.10: Genetische Markierung von dopaminergen Nervenzellen im Riechkolben von TH-A30P α -SYN und TH-Kontrolle Mäusen.....	59
Abbildung 2.11: Instabile Integration von dopaminergen Neuronen in TH-A30P α -SYN Mäusen <i>in vivo</i>	61
Abbildung 2.12: Reduzierte dendritische Spinedichte in adult-geborenen Körnerzellen von A30P α -SYN Mäusen.	64
Abbildung 2.13: Verringerte Spinedichte und Spine Stabilität in adult-geborenen Körnerzellen von A30P α -SYN Mäusen <i>in vivo</i>	66
Abbildung 2.14: Unveränderte Spinemorphologie in adult-geborenen Körnerzellen von A30P α -SYN Mäusen.....	68

Abbildung 2.15: Verlust von präsynaptischen GABAergen Komponenten in apikalen Körnerzellendriten von A30P α -SYN Mäusen.	69
Abbildung 2.16: Erhöhte Empfindlichkeit von adult-geborenen Körnerzellen auf direkte somatische Inputs in A30P α -SYN Mäusen.	71
Abbildung 2.17: Erregende postsynaptische Ströme in Körnerzellen sind seltener, zeigen jedoch größere Amplituden in A30P α -SYN Mäusen.	72
Abbildung 2.18: Therapeutische Effekte von Anle138 auf adult-geborene Neurone in A30P α -SYN Mäusen.	74
Abbildung 3.1: Integrationsmodell für adult-geborene Neurone in A30P α -SYN Mäusen.	78
Abbildung 3.2: Morphologische und funktionelle Ursachen für die verminderte Integration von adult-geborenen Neuronen in A30P α -SYN Mäusen.	84
Abbildung 4.1: Darstellung von Bandenmustern zur Genotypisierung der Mauslinien. ..	98
Abbildung 4.2: TdTomato-Expression unter der Kontrolle des TH-Promoters.	100
Abbildung 4.3: Implantation eines chronisch kranialen Fensters über beiden Riechkolben.	102
Abbildung 4.4: Kinetischer Verlauf der Mikroglia-Aktivierung nach einer Kraniotomie..	104
Abbildung 4.5: Setup zur stereotaktischen Injektion von lentiviralen eGFP und tdTomato Konstrukten.	105
Abbildung 4.6: <i>In vivo</i> Zwei-Photonen-Mikroskopie durch ein kraniales Fenster über beiden Riechkolben.	106
Abbildung 4.7: Anwendungen der <i>in vivo</i> Zwei-Photonen-Mikroskopie zur Untersuchung der adulten Neurogenese im murinen Riechkolben über längere Zeiträume.	109
Abbildung 4.8: Experimentelles Setup zur Testung der Geruchsdiskriminierung und des Geruchsgedächtnisses von Mäusen.	110
Abbildung 4.9: Experimentelles Design für BrdU-Injektionen zur Markierung und Quantifizierung von adult-geborenen Neuronen in SVZ/RMS und Riechkolben.	112
Abbildung 4.10: Kolokalisationsmethode zur quantitativen Analyse von synaptischen Komponenten innerhalb von apikalen Körnerzellendriten.	120

Tabellenverzeichnis

Tabelle 4.1: Primär- und Sekundärantikörper.	115
Tabelle 4.2: Standard-Labormaterialien und Lösungen.	121

Zusammenfassung

Das Protein α -Synuklein (α -SYN) spielt eine kritische Rolle in der Pathogenese des Morbus Parkinson. So wird angenommen, dass die Aggregation dieses Proteins für die Degeneration von dopaminergen Nervenzellen des Mittelhirns und den damit verbundenen motorischen Symptomen verantwortlich ist. Während dieser pathophysiologische Zusammenhang allgemein anerkannt ist, bleibt der Einfluss von α -SYN auf nicht-motorische Systeme des Gehirns und somit auf prämotorische Symptome, wie die häufig früh im Krankheitsverlauf auftretende Riechstörung, relativ unerforscht. Der Riechkolben bildet die erste zentrale Stelle für die Verarbeitung von Geruchseindrücken und stellt eine von wenigen Gehirnregionen mit einer außergewöhnlich hohen neuronalen Plastizität dar, da er kontinuierlich mit neuen adult-geborenen Nervenzellen versorgt wird. Selbst im erwachsenen Gehirn - wenn auch in geringerer Anzahl - wandern in diese Region neuronale Vorläuferzellen aus der subventrikulären Zone (SVZ) und dem rostralen migratorischen Strom (RMS) ein, die in lokale Interneurone ausdifferenzieren und in bestehende Netzwerke integrieren. Dabei bilden neue Nervenzellen funktionelle Synapsen mit bereits vorhandenen Neuronen aus und tragen zur Riechwahrnehmung bei. Aufgrund seiner Funktion an der Synapse könnte α -SYN insbesondere einen Einfluss auf die Reifung und Integration von adult-geborenen Neuronen mit möglichen pathophysiologischen Konsequenzen für den Geruchssinn haben. Um die Plastizität im Riechkolben von transgenen α -SYN Mäusen zu untersuchen, eignet sich besonders die Zwei-Photonen-Mikroskopie, da mit dieser Technik neuronale Strukturen bis hin zu einzelnen Synapsen im intakten neuronalen Netzwerk der lebenden Tiere über mehrere Tage bis Monate verfolgt werden können.

Im ersten Teil der Arbeit wurde der Riechkolben des verwendeten Mausmodells histopathologisch und funktionell untersucht. Die transgenen A30P α -SYN Mäuse wiesen pathologische α -SYN Ablagerungen in Mitralzellen auf, und zeigten Störungen in der feinen Geruchsdiskriminierung. Anschließend wurde eine Subpopulation von adult-geborenen Neuronen, dopaminerge periglomeruläre Neurone, die bekannterweise sensibel auf α -SYN reagieren, genetisch markiert. Mittels intravitaler Zwei-Photonen-Mikroskopie wurde der neuronale Umsatz, der kontinuierliche Neugewinn und Verlust an dopaminergen Nervenzellen, in A30P α -SYN und Wildtypmäusen über einen Zeitraum von 2,5 Monaten beobachtet. Dabei wurde kein Unterschied in der Anzahl an Zellen gemessen, die ihren Zielort im Riechkolben erreichen, und möglicherweise in das Netzwerk integrieren. In den transgenen α -SYN Mäusen wiesen diese Neurone jedoch eine signifikant verkürzte Überlebensspanne auf, was insgesamt in einem Nettoverlust

an Neuronen in der Glomerulärzellschicht resultierte. Interessanterweise waren von dem Zelluntergang vor allem adult-geborene Neurone, die erst kürzlich ins Netzwerk integrierten, betroffen. Diese Ergebnisse zeigen, dass die frühen Schritte der neuronalen Eingliederung und Differenzierung in einen dopaminergen Phänotyp in A30P α -SYN Mäusen nicht beeinträchtigt sind, sondern vielmehr ihr längerfristiges Fortbestehen und Überleben in dem olfaktorischen Netzwerk. Möglicherweise trägt diese instabile Integration und damit gestörte Homöostase von funktionellen neuen Neuronen zu der verminderten Fähigkeit der Geruchsdiskriminierung in A30P α -SYN Mäusen bei.

Um die der Riechstörung zugrunde liegenden pathophysiologischen Veränderungen weiter aufzuklären, wurde im zweiten Teil der Arbeit der Einfluss von aggregationsanfälligem A30P α -SYN auf die strukturelle und funktionelle Entwicklung von Körnerzellen, die 95% der adult-geborenen Neurone darstellen, untersucht. Während die biologischen Eigenschaften und physiologischen Mechanismen von Körnerzellen mit ihrer Rolle bei der Verarbeitung von olfaktorischen Eindrücken weitestgehend aufgeklärt sind, ist nur wenig über die synaptische Funktion und strukturelle Plastizität dieser adult-geborenen Neurone unter pathologischen Bedingungen bekannt. Deshalb wurde im Folgenden die Funktionsweise von adult-geborenen Körnerzellen an dendrodendritischen Synapsen mit stabilen Mitralzellen, die pathologisch verändertes α -SYN akkumulieren, genauer charakterisiert. Diese synaptischen Verbindungen sind von wesentlicher Bedeutung für die Geruchsdiskriminierung. Dazu wurden die gesamten dendritischen Bäume einzelner Nervenzellen mittels zeitlich kodierter lentiviraler Transduktion markiert und chronisch mikroskopiert, wobei einzelne dendritische Spines über mehrere Wochen wiederholt aufgesucht und in hoher Auflösung aufgezeichnet wurden. Adult-geborene Körnerzellen in A30P α -SYN Mäusen waren durch eine reduzierte Komplexität des Dendritenbaumes und eine erniedrigte Spineplastizität, bedingt durch einen verminderten natürlichen Zugewinn an dendritischen Spines während der kritischen Phase der Nervenzellreifung, gekennzeichnet. Dieses Spinedefizit blieb in ausgereiften und integrierten Körnerzellen bestehen. Funktionell waren die unvollständig gereiften Körnerzeldendriten durch eine signifikant verminderte elektrische Kapazität und eine gesteigerte intrinsische Erregbarkeit und Reaktionsfreudigkeit auf depolarisierende Eingangssignale gekennzeichnet, während der Spineverlust mit einer verminderten Frequenz von erregenden postsynaptischen Miniaturströmen (mEPSCs) korrelierte. Die in dieser Arbeit beschriebenen, durch A30P α -SYN vermittelten, Veränderungen der adult-geborenen Neurone wirken sich folglich störend auf die Verarbeitung von olfaktorischen Inputs aus, und könnten deshalb von pathophysiologischer Relevanz für das Verständnis von Riechstörungen in frühen Stadien des Morbus Parkinson sein.

Zusammenfassung

Um diesen Veränderungen therapeutisch entgegenzuwirken, wurde den transgenen Mäusen über mehrere Monate eine Substanz mit anti-aggregativen Eigenschaften verabreicht. Diese zeigte keinen therapeutischen Effekt auf das Überleben und die Spinedichte von adult-geborenen Neuronen in A30P α -SYN Mäusen.

Insgesamt liefert diese Arbeit neue, fundamentale Einblicke in die A30P α -SYN-abhängige Regulation der strukturellen Plastizität als ein pathophysiologisches Korrelat für Morbus Parkinson.

Summary

The protein α -synuclein (α -SYN) plays a critical role in the pathogenesis of Parkinson disease where it is responsible for the degeneration of dopaminergic midbrain neurons and related motor symptoms. Although this function of noxious α -SYN is well recognized, its impact on non-motor circuits of the brain and associated pre-motor symptoms, such as the early olfactory deficit, remains elusive. The olfactory bulb constitutes the first central hub for the processing of odour inputs and represents one of a few brain structures with an extremely high neuronal plasticity, as it is constantly supplied with adult-born neurons. Throughout adulthood - even though in smaller numbers -, this area receives neuronal precursors from the subventricular zone (SVZ) via the rostral migratory stream (RMS) which differentiate into local interneurons and integrate into the existing networks. Thereby, new neurons establish functional synapses with pre-existent nerve cells and contribute to odour perception. Due to its function at the synapse, α -SYN could thus potentially influence the maturation and integration of adult-born neurons with a notable impact on olfactory performance in Parkinson disease. Two-photon-microscopy is a suitable tool to investigate the neuronal plasticity in the olfactory bulb of transgenic α -SYN mice, because it allows the chronic observation of neuronal structures up to the resolution of single synapses in the intact neuronal network of living mice over a period of days to months.

In the first part of the present work, the olfactory bulb of the used mouse model was tested for neuropathological and functional alterations. A30P α -SYN mice showed deposition of pathologically-modified α -SYN in mitral cells, and were impaired in fine odour discrimination. Subsequently, one well-known vulnerable subpopulation of adult-born neurons, the dopaminergic periglomerular neurons, was genetically labelled. Using intravital two-photon imaging, the dynamic process of neuronal turnover, the steady gain and loss of neurons, was followed over a period of 2.5 months in transgenic A30P α -SYN and wild-type mice. The results revealed no difference in the number of cells that reach, and possibly integrate into, the glomerular layer in the olfactory bulb. However, in α -SYN transgenic mice these new neurons have a significantly shortened survival, resulting in an overall reduction in the addition of neurons to the glomerular layer over time. Of note, this neuronal loss specifically targets those cells which have been recently integrated in the network. Such data demonstrates that early stages of incorporation and differentiation into dopaminergic neurons are not affected in transgenic A30P α -SYN mice. Rather, it is their long-term consistency and survival within the olfactory bulb

Summary

network which is defective. Hence, the unstable integration and impaired homeostasis of functional new neurons likely contribute to the odour discrimination deficits observed in mutant A30P α -SYN mice.

To elucidate the pathological changes underlying the olfactory deficit, in the second part of the work, the influence of aggregation-prone A30P α -SYN on the structural and functional development of granule cells, which depict over 95% of all adult-born neurons, was examined. While impressive progress has been made towards interpreting the basic biology and physiological mechanisms of granule cells and their role in processing of olfactory inputs, little is known about the synaptic functions and plasticity of these adult-born neurons under pathological conditions. Thus, the impact of aggregation-prone A30P α -SYN on the functionality of dendrodendritic synapses with the stable mitral cells, which accumulate pathological α -SYN, was characterized in detail, as these connections are essential for odour discrimination. To this end, the full dendritic trees of neurons were first labelled by time-coded lentiviral transduction and then traced chronically, with single dendritic spines being re-located over several weeks and imaged at high resolution. In A30P α -SYN mice, adult-born granule cells showed a retarded development, being characterized by reduced branching of dendrites and diminished dendritic spine plasticity with reduced gain of new spines. The impairments of spines were especially evident during the critical phase of maturation and integration of new neurons into the existing bulbar circuits, and were detected as persistent trait also in mature adult-born neurons. Functionally, retarded dendrites translate into reduced capacitance with enhanced intrinsic excitability and responsiveness of granule cells to depolarizing inputs, while the loss of spines correlates with decreased frequency of mEPSCs. These A30P α -SYN-induced alterations of adult-born neurons are likely to interfere with the processing of olfactory inputs and thereby contribute towards the olfactory deficit of early Parkinson disease.

To counteract these specified changes therapeutically, transgenic mice were administered a compound with anti-aggregative properties over several months. This compound showed no therapeutic effect on the survival and dendritic spine density of adult-born neurons in A30P α -SYN mice.

Together, this work offers new fundamental insights into the α -SYN-dependent regulation of the structural plasticity as a pathophysiological correlate for Parkinson disease.

1 Einleitung

1.1 Adulte Neurogenese im Riechkolben

Im menschlichen Gehirn sind wenige Entwicklungsnischen erhalten, in denen Neurogenese auch noch im Erwachsenenalter stattfindet (Goldman, 1998). Eine der Nischen befindet sich im Riechsystem, wo dem Bulbus olfactorius (Riechkolben; lat. *bulbus*: die Zwiebel, lat. *olfactorius*: riechend) laufend neue, funktionelle Interneurone zugeführt werden. Durch das große heterogene Netzwerk an Interneuronen, die in sich in einem ständigen Austausch von alten und neuen Nervenzellen befinden, stellt der Riechkolben ein System mit einer außergewöhnlich hohen neuronalen Plastizität dar (Mizrahi, 2007; Adam und Mizrahi, 2010). Dieser dynamische Prozess, in dem sich Proliferation und Zelltod in einer natürlichen Balance halten (Biebl et al., 2005; Whitman und Greer, 2009), wird als adulte Neurogenese bezeichnet.

1.1.1 Geschichte

Die meiste Zeit des 20. Jahrhunderts wurde das adulte menschliche Gehirn als statisches System angesehen, in dem die Neurogenese nur während der Embryonalentwicklung auftritt (Colucci-D'Amato et al., 2006), und danach keine Regeneration und kein Wachstum von Axonen oder Dendriten möglich ist (Ramon y Cajal, 1913). Erst in den 1960er Jahren wurde die Neubildung von Zellen nach Verletzung im Hippocampus und olfaktorischen Riechkolben nachgewiesen (Altman, 1962; Altman und Das 1965; Altman, 1969), die später elektronenmikroskopisch eindeutig als Neurone bestimmt wurden (Kaplan und Hinds, 1977). Einen ersten Zusammenhang von Neurogenese und synaptischer Plastizität entdeckten Forscher im Gehirn adulter Singvögel, wo die Neubildung von Nervenzellen funktionell mit dem Erlernen von neuen Liedern assoziiert wurde (Goldman und Nottebohm, 1983; Alvarez-Buylla et al., 1988). Richtige Anerkennung fand die adulte Neurogenese erst in den 1990er Jahren als multipotente neurale Stammzellen aus dem ausgewachsenen Gehirn isoliert wurden (Reynolds und Weiss, 1992) und gezeigt wurde, dass sich teilende Zellen aus der subventrikulären Zone (SVZ) migrieren und zu Neuronen ausdifferenzieren (Lois und Alvarez-Buylla, 1993; Eriksson et al., 1998). Später wurde die adulte Neurogenese unter anderem bei Insekten (Cayre et al., 2007), Reptilien, Amphibien (Chapouton et al., 2007) und Affen (Gould et al., 1998) beschrieben, wobei das genaueste Wissen aus Studien mit Ratten und Mäusen stammt (Altman und Das, 1965; Kempermann et al., 1997). Heute ist bestätigt, dass die Neurogenese während des Erwachsenenalters in zwei Gehirnregionen andauert, im Gyrus dentatus und in der SVZ, die den Hippocampus

(Jun et al., 2012) bzw. den Bulbus olfactorius (Bedard und Parent, 2004; Wang et al., 2011) kontinuierlich mit neuen Nervenzellen versorgen, wenn auch in einem deutlich kleineren Umfang als in der perinatalen Periode.

1.1.2 Neurogenese und Aufbau des Riechkolbens

Die in der SVZ entlang der lateralen Ventrikelwände gebildeten neuronalen Stammzellen (Marker: Sox2, Nestin, GFAP) fungieren als primäre Vorläuferzellen und sind der Gruppe der Typ B Zellen zugehörig, eine Untergruppe von sich langsam teilenden Zellen, die Morphologie, Ultrastruktur und Marker von Astrozyten aufweisen (Abbildung 1.1; Doetsch et al., 1999). Typ B Zellen produzieren Typ C Zellen, welche sich wiederum rasch teilen, um junge Nervenzellen zu generieren, die als Neuroblasten oder Typ A Zellen bekannt sind. Innerhalb der SVZ verlaufen diese DCX-positiven Neuroblasten in tangential verlaufenden Ketten, die sich schräg zu einem rostralen migrierenden Strom (RMS), eine lange Bahn aus wandernden Neuroblasten, verbinden (Abbildung 1.1; O'Rourke et al., 1995). Dabei werden die Neuroblasten von einem longitudinal verlaufenden Netzwerk aus Gliazellen bis in den Riechkolben geleitet, wo sie sich radial an ihre Zielorte verteilen (Lois et al., 1996). Nach ihrer dortigen Ankunft etwa 2 Wochen später reifen und differenzieren die jungen Nervenzellen zu verschiedenen Typen von lokalen inhibitorischen Interneuronen aus, welche alle den Neurotransmitter γ -Aminobuttersäure (GABA) nutzen (Kosaka et al., 1995; Carleton et al., 2003), jedoch unterschiedliche chemische und elektrophysiologische Eigenschaften aufweisen (Kosaka und Kosaka, 2007). Die beiden Haupttypen umfassen einen kleinen Anteil an periglomerulären Nervenzellen (5%) und eine Mehrheit an Körnerzellen (95%) (Lledo und Saghatelian, 2005; Lledo et al., 2006). Während die periglomerulären Neurone an der Oberfläche des Riechkolbens um die olfaktorischen Glomeruli verteilt sind (0-150 μm tief), liegen die Zellkörper der Körnerzellen deutlich tiefer in der Körnerzellschicht (250-500 μm tief). Letztere erhalten die ersten Synapsen auf ihren basalen Dendriten, bevor ihre apikalen Dendriten in die oberflächlicher gelegenen Zellschichten der externen plexiformen Schicht auswachsen, wo sich ihr Baum weiter verzweigt und die dendritische Spinedichte ansteigt. Erst dann verbinden sich ihre apikalen Dendriten synaptisch mit den Mitral-/Tufted-Zellen (Abbildung 1.1, Abbildung 1.3a; Shepherd et al., 2007; Whitman und Greer, 2009), die sich zwischen der externen plexiformen Schicht und der Körnerzellschicht befinden. Diese speziellen Verbindungen zwischen den stabilen Projektionsneuronen und den adult-geborenen Körnerzellen in Form von apikalen, dendrodendritischen Synapsen (Abbildung 1.3a) spielen eine wichtige Rolle bei der Unterscheidung von Geruchsstoffen (olfaktorische Diskriminierung) (Lledo et al., 2006; Lepousez et al., 2013).

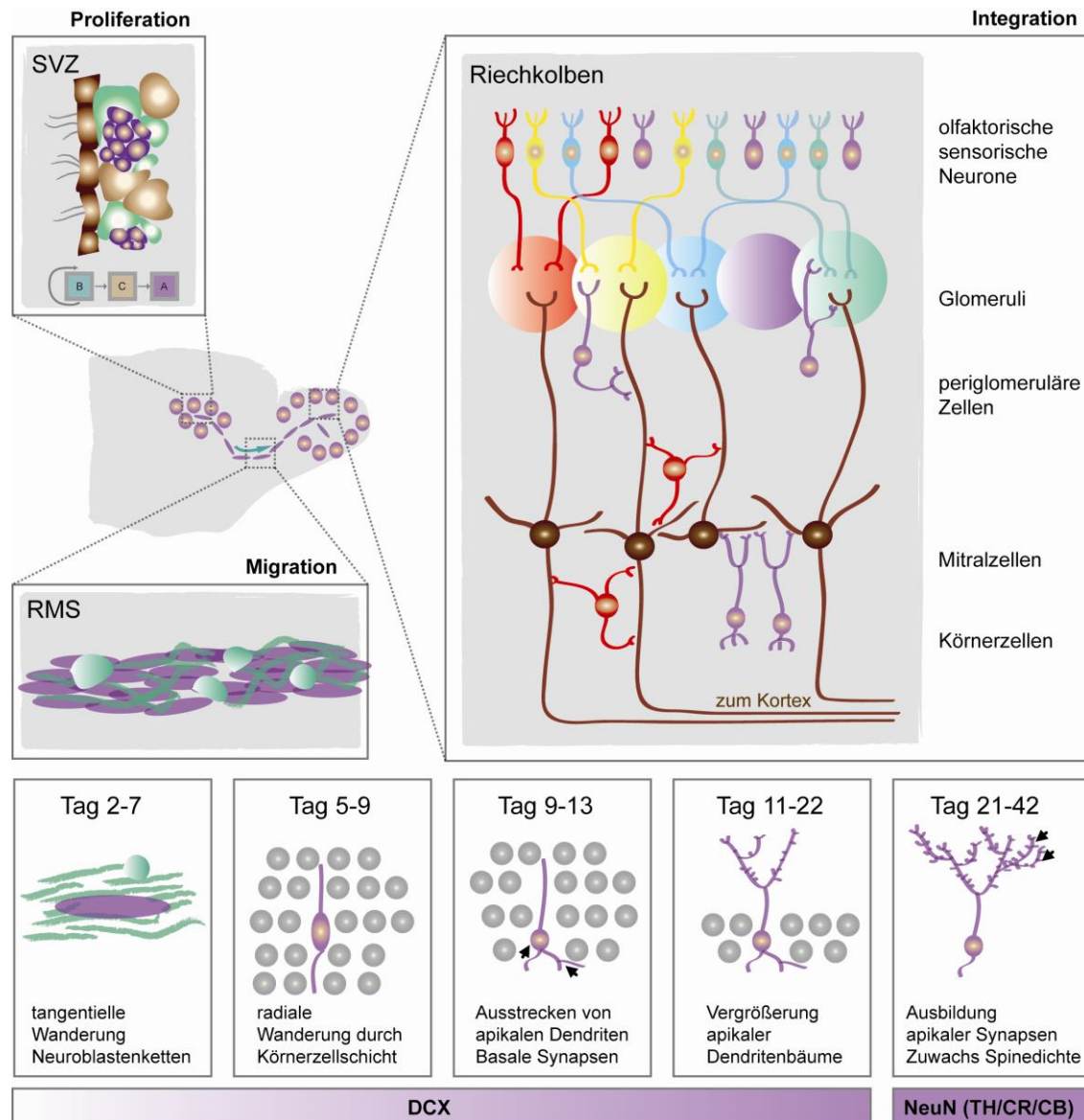


Abbildung 1.1: Adulte Neurogenese im Riechkolben. Der Subventrikuläre Zone (SVZ)-Riechkolben Signalweg stellt einen der wenigen beständigen neurogenen Nischen des adulten Zentralnervensystems (ZNS) dar (nach Lledo et al., 2008; Whitman und Greer, 2009). In dem sagittalen Schnitt des murinen Vorderhirns wandern Neuroblasten (lila) tangential (grüner Pfeil) in Richtung Bulbus olfactorius, wo Neurone des bestehenden Netzwerkes ständig durch neue, einwandernde Nervenzellen ersetzt werden. (oben links) Proliferation in der SVZ findet in den lateralen Ventrikelwänden statt, wo aus Stammzellen (grün, Typ B Zellen) sich schnell teilenden Zellen (braun, Typ C Zellen) entstehen. Diese wiederum bilden Neuroblasten (lila, Typ A Zellen, DCX-positiv), die über den rostralen migrierenden Strom (RMS, unten links) in den Riechkolben einwandern, wo sie zu lokalen Interneuronen (NeuN/TH/CB/CR) ausdifferenzieren und integrieren. (rechts) Verschaltungen des Riechkolbens: Jedes olfaktorische Sensorneuron (OSN) exprimiert nur einen der 1.000 Geruchsrezeptorgene, und alle Axone von Zellen des gleichen Rezeptortypes projizieren in einen oder wenige Glomeruli. Ca. 2.000 Glomeruli, runde 50-100 µm große Knäule aus Neuropil, beherbergen Axone von OSN, apikale Dendriten von Mitral-/Tufted-Zellen (M/TZ) und Dendriten von periglomerulären Zellen. Die Aktivität von M/TZ wird von zwei Interneuronentypen reguliert: periglomerulären Zellen und Körnerzellen (lila) und Zellen mit kurzen Axonen (rot). (unten) Migration, Entwicklung und Integration von Körnerzellen, die mit 95% die Mehrheit der neugeborenen Zellen darstellen. Körnerzellen erhalten die ersten Synapsen auf ihren basalen Dendriten bevor ihre apikalen Dendriten in die oberflächlicher gelegene Zellschichten der externen plexiformen Schicht auswachsen, wo sich ihr Baum weiter verzweigt und die dendritische Spinedichte ansteigt. Erst dann verbinden sich ihre apikalen Dendriten synaptisch mit den M/TZ.

1 Einleitung

Dagegen weist nur ein Teil der eher kompakten periglomerulären Zellen, die ebenfalls dendrodendritische Synapsen mit Mitralzellen eingehen (Lepousez et al., 2013), dendritische Spines auf (Mizrahi, 2007).

Adult-geborene periglomeruläre Neurone können in drei chemisch definierte Subpopulationen mit nicht-überlappenden Phänotypen entsprechend ihrer Immunreaktivität auf Tyrosinhydroxylase (TH), das wichtigste Enzym im Dopaminstoffwechsel, oder auf die Kalzium-bindenden Proteine Calretinin (CR) und Calbindin (CB), eingeteilt werden (Abbildung 1.2; Kosaka und Kosaka, 2007; Parrish-Aungst et al., 2007). Kürzlich wurde außerdem eine neue Parvalbumin-positive Population an Interneuronen in der externen plexiformen Schicht nachgewiesen (Kato et al., 2013; Miyamichi et al., 2013). Die genaue Verteilung der Zellen mit unterschiedlichen Markergenen und ihre funktionelle Bedeutung sind jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt, und hängen vermutlich von verschiedensten Faktoren, unter anderem vom Alter des Tieres, ab (Hack et al., 2005; Kosaka und Kosaka, 2007; Ninkovic et al., 2007; Batista-Brito et al., 2008; Adam und Mizrahi, 2011).

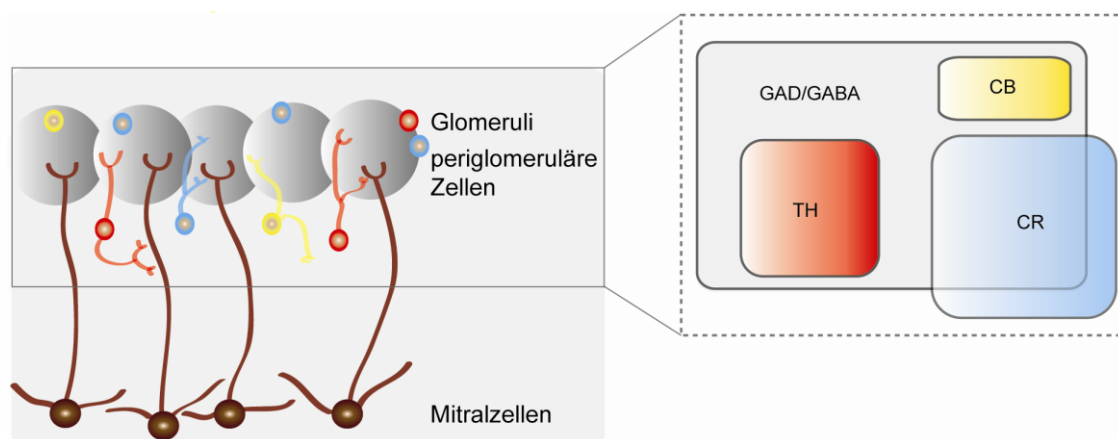


Abbildung 1.2: Zellzusammensetzung der periglomerulären Schicht in der Maus. Schematische Darstellung nach Kosaka und Kosaka (2007). Die gestrichelte Linie deutet die Gesamtheit an periglomerulären Zellen an. Die einzelnen chemisch definierten Phänotypen sind in der ungefähren Größe ihres Populationsanteils wiedergegeben. Alle dopaminergen Tyrosinhydroxylase (TH)-positiven Zellen (rot), alle Calbindin (CB)-positiven Zellen (gelb) und 65% der Calretinin (CR)-positiven Zellen (blau) sind gleichzeitig positiv für Glutamat-Decarboxylase (GAD) und γ -Aminobuttersäure (GABA). Während die Expressionen von chemischen Substanzen in anderen Gehirnregionen weitestgehend aktivitätsabhängig reguliert werden, findet diese Regulation in den Glomeruli zum Teil transsynaptisch durch die Aktivität des Riechnervs statt.

1.1.3 Neuronale Plastizität im Riechkolben

In den Riechkolben von jungen adulten Nagetieren wandern täglich zwischen 10.000 und 80.000 neue Nervenzellen ein (Kaplan et al., 1985; Lois und Alvarez-Buylla, 1994). Dies bedeutet, dass pro Tag 1% der ca. sieben Millionen vorhandenen Körnerzellen

ausgetauscht werden (Biebl et al., 2000; Kaplan et al., 1985). Im Gegensatz dazu ist die Neurogenese im Hippocampus mit 9.000 neuen Zellen pro Tag deutlich niedriger (Alvarez-Buylla et al., 2001), was einem täglichen Umsatz von 0,03% der gesamten Nervenzellpopulation entspricht (Kempermann et al., 1997). Diesem kontinuierlichen Gewinn an neuen Nervenzellen zu einem stabilen Netzwerk wirkt ein regelmäßiger und ausgleichender Verlust an Zellen entgegen (Biebl et al., 2000). Auf diese Weise werden durch balancierten Zellumsatz, der Summe an gewonnenen und verlorenen Nervenzellen, konstante Neuronenzahlen im Riechkolben aufrechterhalten (Lledo et al., 2006). Über die Hälfte der neu ankommenden Nervenzellen scheitern bei der Integration in das bestehende Netzwerk und werden apoptotisch, nachdem sie ihren Zielort erreicht haben (Winner et al., 2002). Diese kritische Phase für das Überleben der neugeborenen Neurone beträgt zwischen 14 und 60 Tagen nach ihrer Entstehung in der SVZ, und umfasst die Zeit der Reifung der neuen Zellen und ihre Integration in das Riechkolben-Netzwerk (Carleton et al., 2003; Yamaguchi und Mori, 2005; Kelsch et al., 2009). Nach erfolgreicher Integration können die neuen Neurone bis zu 19 Monaten im Netzwerk überleben (Kaplan et al., 1985; Winner et al., 2002), sodass die neu rekrutierten Nervenzellen trotz ihrer hohen Sterberate einen beträchtlichen Anteil von über 50% der Gesamtpopulation an lokalen Interneuronen im adulten Riechkolben ausmachen (Rosselli-Austin und Williams, 1990; Petreau und Alvarez-Buylla, 2002; Lemasson et al., 2005). Der Prozess der Integration stellt daher eine große Herausforderung für die adult-geborenen Neurone dar, und hängt unter anderem stark von der Gesamtaktivität des lokalen Netzwerkes und verschiedenen äußeren Einflüssen ab (Ming und Song, 2011; Lepousez et al., 2013). Während der Reifungs- und Integrationsphase weisen die adult-geborenen Neurone eine ausgesprochen hohe strukturelle Dynamik auf, die auch nach ihrer Integration teilweise erhalten bleibt (Abbildung 1.8b,d; Mizrahi et al., 2007; Livneh und Mizrahi, 2011). Dabei findet eine kontinuierliche Abschaltung und Neuverschaltung der dendritischen Verbindungen statt, sodass noch lange nach Integration in das Netzwerk neue Spines gebildet werden (Livneh und Mizrahi, 2009). Außerdem wurde gezeigt, dass sich die Komposition von periglomerulären Interneuronen mit dem Alter verändert, anstatt nur ausgetauscht zu werden (Adam und Mizrahi, 2011). Insgesamt stellt der Riechkolben mit seinen Neuronen und Synapsen somit ein System von äußerst hoher struktureller Plastizität dar.

1.1.4 Geruchsdiskriminierung und dendrodendritische Synapsen

Geruchsdiskriminierung beginnt im Riechepithel, wo auf die Schleimhaut auftreffende Geruchsstoffe an die Chemorezeptoren von olfaktorischen Sensorneuronen (OSN) binden (Lledo et al., 2005). Die einzelnen OSN exprimieren jeweils nur eine Art von

1 Einleitung

Geruchsrezeptor aus einer großen Genfamilie mit rund 1000 verschiedenen Rezeptortypen (Buck und Axel, 1991), und projizieren ihre Axone in einen spezifischen Glomerulus innerhalb des Riechkolbens (Abbildung 1.1). Durch den Kontakt ihrer Nervenzellfortsätze mit den primären Dendriten von Mitral-/Tufted-Zellen, wird die Geruchsinformation über die langen Axone dieser Zellen aus dem Riechkolben in den olfaktorischen Kortex weitergeleitet (Shepherd et al., 2007). Diese Trennung der Geruchsinformation auf der Ebene der OSN und Glomeruli wird als erster fundamentaler Schritt in der Geruchsdiskriminierung angesehen (Shepherd et al., 2007; Lledo et al., 2005). Der komplexe Vorgang beschreibt jedoch noch nicht vollständig die Identifizierung der einzelnen Geruchsstoffe, da die Geruchsrezeptoren unterschiedliche Geruchsstoffe mit ähnlichen Strukturen binden können, wodurch verschiedene Glomeruli unterschiedlich stark aktiviert werden (Wachowiak und Shipley, 2006). Mitral-/Tufted-Zellen kommunizieren mit einem großen Netz aus lokalen inhibitorischen GABAergen Interneuronen, die mit einem Verhältnis von 100:1 den exzitatorischen Nervenzellen in der Überzahl sind (Shepherd et al., 2007). Dies ist ein deutlich höherer Anteil als in anderen Gehirnregionen, wie z.B. dem Neokortex (1:5) (Markram et al., 2004). Die Tatsache, dass Anregung und Hemmung im Riechkolben in einem Gleichgewicht stehen, ein Zustand der auch zwischen unterschiedlichen Tierarten konserviert ist, deutet auf eine wichtige Funktion der inhibitorischen Interneurone bei der Verarbeitung der Geruchsinformation.

Bei der Geruchsdiskriminierung weisen dendrodendritische Synapsen zwischen GABAergen Interneuronen und Mitral-/Tufted-Zellen eine Schlüsselrolle auf (Wachowiak und Shipley, 2006; Lepousez et al., 2013). In Abbildung 1.3a ist beispielhaft die bidirektional funktionierende dendrodendritische Synapse zwischen dem lateralen Dendriten einer Mitralzelle und dem apikalen Dendriten einer Körnerzelle dargestellt. Auf der Seite der Körnerzelle beherbergt ein ungewöhnlich großer Spinekopf die Ausrüstung für sowohl prä- als auch postsynaptische Prozesse (Price und Powell, 1970), während auf der Seite der Mitralzelle die dendrodendritischen Kontakte in dichten Reihen entlang des lateralen Dendriten angeordnet sind (Woolf et al., 1991). Als direkte Antwort auf die exzitatorische Glutamatausüttung der Mitralzelle führt der Einstrom von Kalziumionen (Ca^{2+}) zur Aktivierung von NMDA- und AMPA-Rezeptoren und schließlich zur Abgabe von GABA aus dem Spine der Körnerzelle (Chen et al., 2000). Der inhibitorische Transmitter bewirkt in einer negativen Feedback-Schleife wiederum die Selbsthemmung der Mitralzelle, sowie die laterale Hemmung von benachbarten Mitralzellen. Dieser schnell ablaufende Mechanismus dient als wichtiger Filter zur Feinabstimmung und Kontrastschärfung von Geruchseindrücken (Luo und Katz, 2001; Shepherd et al., 2007).

1.1.5 Riechfunktion adult-geborener Neurone

Wie ist es möglich, dass sich die Interneurone des Riechkolbens auch noch im Erwachsenenalter in einem ständigen Austausch befinden, wenn das olfaktorische Netzwerk bereits in Betrieb ist? Welche funktionelle Bedeutung haben neugeborene Neurone?

Die Verarbeitung von Geruchsinformationen beginnt bei den OSN im Riechepithel, die chemische Signale in elektrische Signale umschreiben (Abbildung 1.3b,c). Mitralzellen verteilen diese neuronale Aktivität in einem zweiten Transformationsschritt auf nachgeschaltete Strukturen, adult-geborene Neurone und ‚top-down‘ Verbindungen, d.h. Zentrifugalfasern, die Informationen von höheren (olfaktorischer Kortex) auf niedrigere Strukturen (Riechkolben) übertragen. Dabei hängt die Fähigkeit, Geruchsinformationen auszuwerten, insbesondere von den synaptischen Verbindungen des gesamten Netzwerkes ab (Carleton et al., 2003; Ming und Song, 2011). Folglich haben die plastischen Interneurone einen großen Einfluss auf die Geruchsverarbeitung, da sie einen beträchtlichen Beitrag zur Strukturhaltung des Netzwerkes leisten, indem sie sterbende Interneurone ersetzen (Lazarini und Lledo, 2011). Das erfolgreiche Überleben und die vollständige dendritische Ausreifung und funktionelle synaptische Integration der adult-geborenen Nervenzellen in bereits bestehende Netzwerke spielt deshalb eine sehr wichtige Rolle für die Verarbeitung sensorischer Informationen, das olfaktorische Lernen und Gedächtnis (Carlen et al., 2002; Alonso et al., 2012; Lazarini und Lledo, 2011), und die Geruchsdiskriminierung (Alonso et al., 2008, 2012). Obwohl der funktionelle Beitrag von adult-geborenen Neuronen zur Riechfunktion mehrfach belegt wurde, bleiben noch Fragen offen (Lazarini und Lledo, 2011), die vor allem die Aufklärung der Mechanismen zur Entstehung der synaptischen Verbindungen der adult-geborenen Neurone und ihr Beitrag zur Riechfunktion verlangen. In welchem Stadium tragen adult-geborene Nervenzellen erstmals zum Erlernen von Geruchswahrnehmungen, Geruchsdiskriminierung und Geruchsgedächtnis bei? Was sind die zellulären und molekularen Mechanismen der Geruchswahrnehmung und Geruchsdiskriminierung? Welchen Beitrag leisten die Neurone zu Reparaturvorgängen des Gehirns bei Traumata oder neurodegenerativen Erkrankungen?

1.1.6 Extrinsische und intrinsische Modulation der adulten Neurogenese

Die adulte Neurogenese wird durch unterschiedliche exogene und endogene Faktoren moduliert, die sich gegenseitig beeinflussen. Beispielsweise wurde in mehreren Studien gezeigt, dass eine mit Gerüchen angereicherte Umgebung das Überleben von periglomerulären Neuronen und Körnerzellen im Riechkolben fördert (Petreanu und Alvarez-Buylla, 2002; Alonso et al., 2006) und die Expression von Plastizitäts-relevanten

Molekülen verändert (Bovetti et al., 2009). Darüber hinaus bewirkt die Geruchsanreicherung eine längere Erhaltung des konstitutiven Körnerzellumsatzes und damit ein verbessertes Geruchsgedächtnis (Rocheffort et al., 2002). Sind adult-geborene Neurone während ihrer Entwicklung einer Geruchsanreicherung ausgesetzt, erhöht sich ihre Selektivität auf Gerüche nach der Reifung (Livneh et al., 2014). Im Hippocampus führt eine reizangereicherte Umgebung (Kempermann et al., 1997) und sportliche Aktivität durch Laufen (van Praag et al., 1999) zu einer erhöhten Proliferation und einem gesteigerten Überleben neuer Neurone. In transgenen deprimierten Mäusen führen diese Maßnahmen sogar zu einer Wiederherstellung der adulten Neurogenese und physiologischen BDNF-Proteinspiegeln (Jha et al., 2011). Nasenokklusion wirkt sich dagegen negativ auf die Anzahl an adult-geborenen Körnerzellen und ihren Synapsen im Riechkolben aus (Saghatelian et al., 2005; Mandairon et al., 2006). Entzündungsreaktionen stellen weitere negative Modulatoren der adulten Neurogenese dar (Ekdahl et al., 2009; Tepavčević et al., 2011). In transgenen Mausmodellen der Multiplen Sklerose (MS) wurde eine Reduktion an adult-geborenen Nervenzellen im Riechkolben, bedingt durch eine verminderte Proliferation von neuen Zellen in der SVZ mit veränderter Expression der Transkriptionsfaktoren Olig2 und Dlx2 gemessen. Diese Veränderungen resultierten in Riechstörungen der Mäuse, die auch in MS-Patienten beobachtet werden. Außerdem wurde ein Zusammenhang zwischen Epilepsie und fehlerhafter adulter Neurogenese beobachtet, die zur Manifestation der Krankheit und ihren Begleitsymptomen beitragen könnte (Rotheneichner et al., 2013). In Mausmodellen der Alzheimerschen Erkrankung führt die Mutation in Presenellin-1 (PS-1) zu einer verminderten Bildung und einem reduzierten Überleben von neuen Zellen im Hippocampus, nicht jedoch im Riechkolben, während die schwedische Mutation im amyloiden Vorläuferprotein (APP) die adulte Neurogenese in beiden Gehirnregionen verringert (Chuang, 2010).

Als endogene Regulatoren der Neurodegeneration spielt die Aktivität von Mikroglia, Astrozyten und einwandernden Makrophagen eine wichtige Rolle, die verschiedene Zytokine, Chemokine, Neurotransmitter und reaktive oxidative Spezies (ROS) absondern (Mu et al., 2010; Yoneyama et al., 2011; Lazarini et al., 2012). Diese endogenen Faktoren verursachen Veränderungen an umliegendem Gewebe und Neuronen, und schaffen damit sowohl nachteilige als auch günstige Bedingungen für die adulte Neurogenese, wobei sie sowohl die Proliferation, Migration, Differenzierung, Integration als auch das Überleben der neuen Zellen über unterschiedliche Signalkaskaden beeinflussen (Mu et al., 2010). Dabei spielt das Gesamtprofil der endogenen Faktoren eine wichtige Rolle für die Regulation von Neuroregeneration und Neurodegeneration.

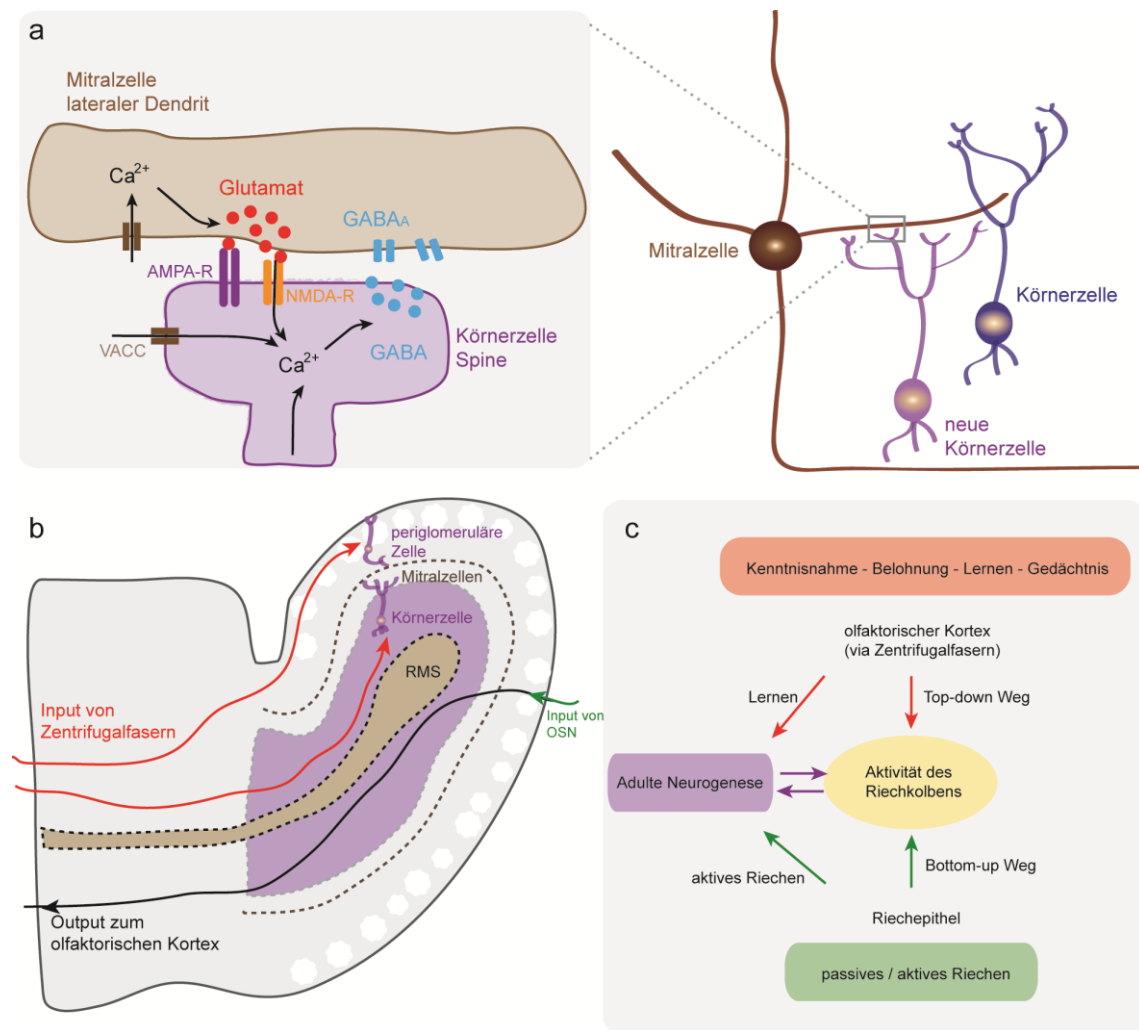


Abbildung 1.3: Dendrodendritische Synapsen und ihre Funktion im Riechkolben. (a; nach Lepousez et al., 2013) In der externen plexiformen Schicht kommunizieren die lateralen Dendriten von Mitral-/Tufted-Zellen (M/TZ) mit den dendritischen Spines von Körnerzellen (KZ) über die reziproke dendrodendritische Synapse. In dieser Synapse führt der lokale Eintritt von Kalziumionen (Ca^{2+}) in den M/TZ Dendriten zur Ausschüttung von Glutamat (rot), was sowohl AMPA- (lila) als auch NMDA- (orange) Rezeptoren auf dem KZ-Spine aktiviert. Diese postsynaptische Aktivierung kann direkt oder indirekt mittels spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen (VACC, braun) die lokale Ca^{2+} -Konzentration im Spine erhöhen. Diese wiederum triggert die Ausschüttung von GABA und die postsynaptische Hemmung der M/TZ über GABA_A-Rezeptoren (blau). Neben KZ bilden auch GABAerge periglomeruläre Zellen dendrodendritische Synapsen aus. (b; nach Lazarini und Lledo, 2011) Schematische Darstellung des murinen Riechkolbens mit seinen Verbindungen. Der Riechkolben erhält Input von OSN (grün) und Zentrifugalfasern. Der Output verläuft über M/TZ, die in den olfaktorischen Kortex projizieren. OSN projizieren ihre Axone in die Glomeruli (weiß), wo sie M/TZ und periglomeruläre Zellen durch Glutamatausschüttung aktivieren. Zentrifugalfasern modulieren die Aktivität von inhibitorischen Interneuronen, die wiederum die M/TZ-Aktivität über dendrodendritische Synapsen (Dopamin-, GABA-Ausschüttung) regulieren. (c) Modulation der Riechkolbenaktivität. Die neuronale Aktivität des Netzwerkes hängt von drei zusammenhängenden Vorgängen ab, (i) sensorischer Input vom Riechepithel (Bottom-up Weg), (ii) Zentrifugalfasern (Top-down Weg) und (iii) Adulte Neurogenese. Das Riechepithel übermittelt die Geruchsinformation durch passive Geruchswahrnehmung oder aktives Riechen an den Bulbus olfactorius. Zentrifugalfasern tragen zur kontextabhängigen Modulation der Netzwerkaktivität bei (Kenntnisnahme, Belohnung, Lernen und Gedächtnis). Jede Aktivierung des Netzwerkes beeinflusst die Rekrutierung von neuen Nervenzellen, die wiederum die momentane Aktivität des bestehenden Netzwerkes beeinflusst. Adulte Neurogenese reagiert sensibel auf Geruchserfahrungen (Geruchsentzug, geruchsangereicherte Umgebung) und den Verhaltenszustand (Erlernen der Unterscheidung von Gerüchen).

1.2. Morbus Parkinson

1.2.1 Die Krankheit - Klinische Symptome, Häufigkeit und Therapie

Die Parkinsonsche Erkrankung (Morbus Parkinson) ist eine progressive neurodegenerative Erkrankung, die durch vier charakteristische Symptome einer Bewegungsstörung gekennzeichnet ist: Tremor (=Zittern), Rigidität (=Steifheit), Akinese/Bradikinese (=Bewegungshemmung/verlangsamte Bewegung) und posturale Instabilität (=Haltungsschwäche) (Abbildung 1.4f; Jankovic, 2008). Weiter treten oftmals früh im Krankheitsverlauf eine Minderung des Geruchssinns (Hyposmie; Doty et al., 1989), ein gesteigertes Schmerzempfinden (Truini et al., 2013), Schlafstörungen (Raggi et al., 2013), Depressionen (Starkstein et al., 2012) und Verdauungsstörungen (Adler et al., 2011; Del Tredici und Jost, 2012) auf. So entstehen Riechstörungen bei über 90% der Parkinsonpatienten mindestens 4 Jahre vor dem Auftreten erster motorischer Symptome (Doty et al., 1988; Haehner et al., 2011). Außerdem sind kognitive Störungen ein häufiges Symptom bei Morbus Parkinson, die mit einer dopaminergen Dysfunktion im präfrontalen Kortex einhergehen und im späten Krankheitsstadium zu einer Demenz und amnestischer Dysfunktion führen können (Narayanan et al., 2013).

Die Bewegungsstörungen des Morbus Parkinson werden durch verminderte Dopaminspiegel in den Basalganglien des Gehirns hervorgerufen (Jankovic, 2008), die auf den Verlust von Dopamin-ausschüttenden Zellen in der Substantia nigra pars compacta zurückzuführen sind (Abbildung 1.4e). Da diese Neurone ins Striatum projizieren resultiert ihr Verlust in einer veränderten Aktivität von neuronalen Netzwerken innerhalb der Basalganglien, welche für die Bewegungssteuerung verantwortlich sind (Abbildung 1.4f); (i) über einen direkten Weg (über den internen Globus pallidus), der die Bewegung erleichtert, und (ii) über einen indirekten Weg (über den externen Globus pallidus und Nucleus subthalamicus), der bewegungshemmend wirkt. Die Dopaminausschüttung erhöht die Empfindlichkeit des direkten Signalweges, während es den indirekten Weg hemmt. Da normalerweise beide Signalwege benötigt werden, um hemmend auf die Basalganglien einzuwirken und dabei die Bewegung zu erleichtern, führt die Schädigung von dopaminergen Zellen der Substantia nigra zu einem unnatürlich hohen inhibitorischen Einfluss der Basalganglien auf den Thalamus. Dadurch wird die thalamische Aktivierung der oberen Motorneurone in der Hirnrinde beeinträchtigt, was in der verminderten Fähigkeit der Bewegungsausübung (Hypokinesie) resultiert.

Die Behandlung von Parkinson erfolgt deshalb im Wesentlichen durch Medikamente, die den Dopaminmangel ausgleichen (Jankovic und Poewe, 2012). Das wichtigste Arzneimittel ist L-Dopa (Levodopa), eine Vorstufe des Dopamins, das die Blut-Hirn-

Schranke passieren kann. Da als Nebenwirkung einer langjährigen Einnahme Dyskinesien (unwillkürliche Bewegungen) auftreten, die auf die kurze Wirkdauer von L-Dopa am Dopaminrezeptor zurückzuführen sind, werden zu Beginn der Krankheit meist länger wirkende Dopaminagonisten, Monoaminoxidase Typ B Inhibitoren (Selegilin, Rasagilin) verabreicht, die den Abbau von Dopamin im Gehirn verlangsamen. Hemmstoffe der Catechol-O-Methyltransferase (Entacapon, Tolcapon) werden in Kombination mit L-Dopa eingesetzt, um dessen Abbau zu inaktiven Metaboliten zu hemmen und seine Plasmahalbwertszeit zu verlängern. Darüber hinaus werden tiefe Hirnstimulation, Bewegung und Nahrungsergänzungsmittel, wie Coenzyme Q10 und Kreatin, zur Unterstützung der Parkinsontherapie eingesetzt (Jankovic und Poewe, 2012).

Die Ursache für den selektiven Untergang von dopaminergen Nervenzellen ist noch nicht vollständig aufgeklärt, und es werden unterschiedliche Vorgänge der neuronalen Schädigung diskutiert, die letztendlich zum Zelltod führen (Abbildung 1.6). Mögliche Mechanismen sind unter anderem oxidativer Stress und Zelltoxizität durch Proteinaggregation (Mc Naught und Jenner, 2001; Friedman und Galazka-Friedman, 2001; Soto, 2003; Obeso et al., 2010).

Die klassischen neuropathologischen Merkmale des Morbus Parkinson stellen abnormale Akkumulationen des α -Synuklein Proteins (α -SYN) dar, die zusammen mit Ubiquitin, Neurofilament und anderen Proteinen in Form von runden zytoplasmatischen Einschlüssen, den Lewy Körperchen und Lewy Neuriten, im Zytosol nachweisbar sind (Abbildung 1.4a-d; Spillantini et al., 1997; Baba et al., 1998). Obwohl die Ultrastruktur dieser runden Einschlüsse mit einem dichten, eosinophilen Kern und einem blassen Halo bereits 1865 von Duffy und Tennyson beschrieben wurde, brachte Friedrich Lewy die Lewy Körperchen erstmals mit Parkinson in Verbindung (Forster und Lewy, 1912). Die intrazellulären Aggregate weisen ein dichtes Netzwerk aus fibrillären, amyloiden Polymeren mit einer typischen β -gekreuzten Faltblattstruktur auf, die sich mit spezifischen Farbstoffen wie Kongorot und Thioflavin S anfärben lassen, und hochresistent gegenüber Proteolyse sind (Conway et al., 2000; Forman et al., 2004). Ein weiteres neuropathologisches Merkmal sind Marinesco Körperchen (Abbildung 1.4c; Blocq und Marinsec, 1893), runde Ubiquitin-positive Einschlüsse im Zellkern, die Störungen des Ubiquitin-Protease-Systems (UPS) anzeigen (Kanaan et al., 2007), und deren Anzahl im Alter ansteigt (Beach et al., 2004).

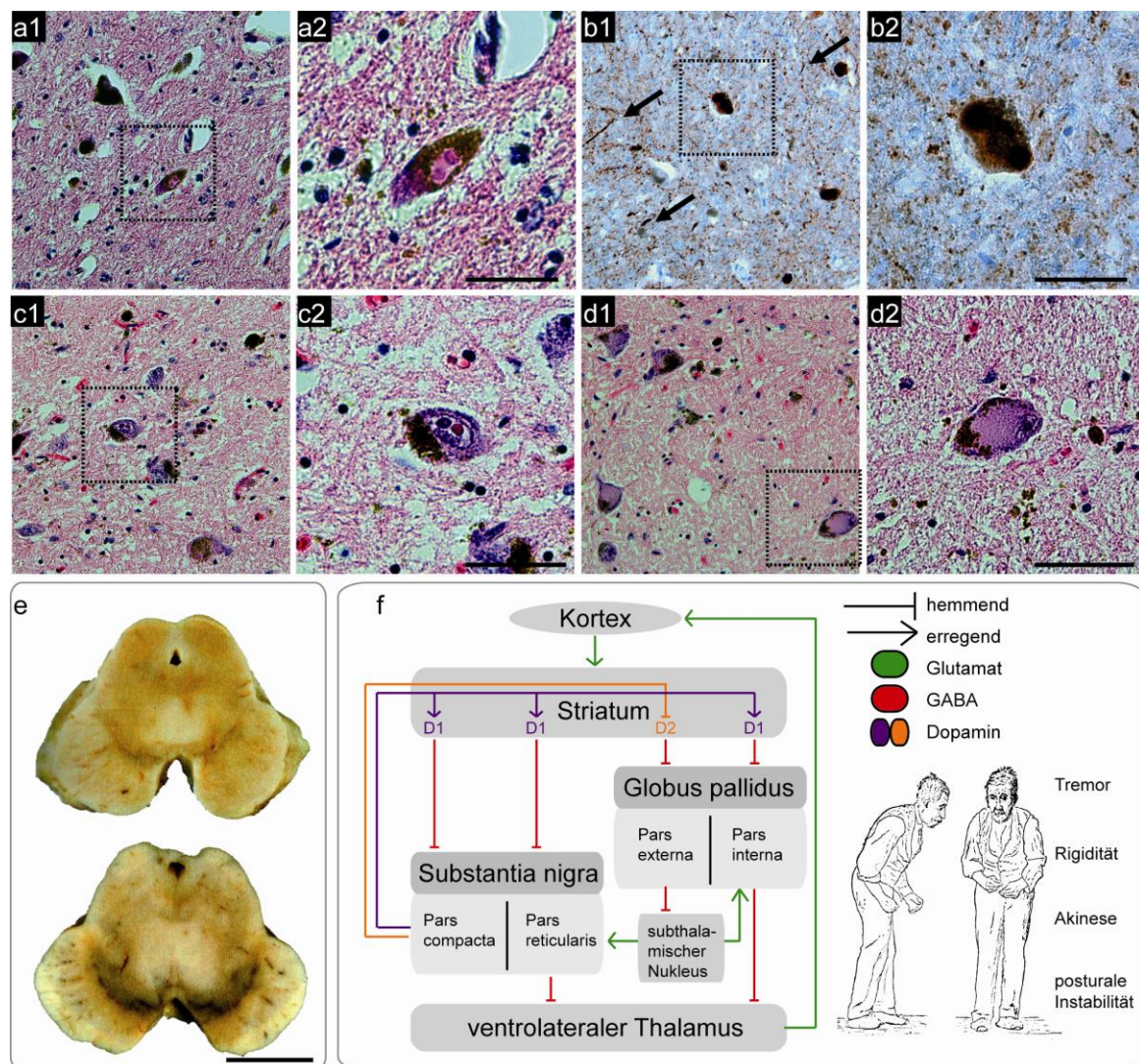


Abbildung 1.4: Pathologische Kennzeichen des Morbus Parkinson. (a-d) Histologische Gehirnpräparate zeigen die neuropathologischen Merkmale eines Parkinsonpatienten in Braak Stufe VI. Sie wurden freundlicherweise von Prof. Hans Kretzschmar (Institut für Neuropathologie; Ludwig-Maximilians-Universität München) für die Aufnahmen zur Verfügung gestellt. (a1) Übersicht zeigt melaninhaltige, pigmentierte Zellen (braun) der Substantia nigra in einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung. (a2) In dem vergrößerten Bildausschnitt sind in einem Neuron zwei runde, eosinophile Lewy Körperchen (magenta) sichtbar, die fibrillären zytoplasmatischen Aggregate des α -SYN Proteins. Maßstab - 20 μ m (b1) Die Färbung mit einem Antikörper gegen humanes α -SYN (SYN42) zeigt mehrere Lewy Körperchen (braun) und Lewy Neuriten (braun; schwarze Pfeile) im Locus caeruleus, eine Region im Hirnstamm, die zeitig von der Neuropathologie betroffen ist. (b2) In der vergrößerten Aufnahme sind die typischen runden Zelleinschlüsse zu erkennen. Maßstab - 20 μ m. (c1, c2) Ein weiteres neuropathologisches Merkmal sind Marinesco Körperchen, runde Ubiquitin-positive Einschlüsse im Zellkern, die Störungen des Ubiquitin-Protease-Systems (UPS) anzeigen. Maßstab - 20 μ m. (d1,d2) Vorläufer von Lewy Körperchen werden als Pale Körperchen bezeichnet. Sie besitzen eine weniger eosinophile Struktur mit einer blassen, glasigen Fläche und keinem Halo. Maßstab - 20 μ m. (e, nach Boecker et al., 2008) Übersicht zeigt einen beinahe vollständigen Verlust an pigmentierten Neuronen in der Substantia nigra eines Parkinsonpatienten (oben) im Vergleich zu einem gesunden Mittelhirn (unten). Maßstab - 1 cm. (f, nach Trepel, 2008) Diagramm über die Vernetzung der Kerne im Basalgangliensystem des Gehirns, die unter dem Kortex liegen und anatomisch und funktionell eng miteinander verbunden sind. Verlust von dopaminergen Zellen der Substantia nigra führt zu einem unnatürlich hohen inhibitorischen Einfluss der Basalganglien auf den Thalamus, wodurch die thalamische Aktivierung der oberen Motorneurone in der Hirnrinde und damit die Bewegungsausübung, beeinträchtigt werden. Typische Körperhaltung eines Parkinsonpatienten mit den vier Kardinalsymptomen (nach Gowers, 1886).

Außerdem werden häufig Vorläufer von Lewy Körperchen, sogenannte Pale Körperchen im Gehirn von Parkinsonpatienten detektiert (Abbildung 1.4d). Sie weisen eine weniger eosinophile Struktur mit einer blassen, glasigen Fläche und keinem Halo auf, und kommen ebenfalls im Zellplasma vor (Pappolla et al., 1988; Wakabayashi et al., 2013). Interessanterweise ist der kranke Bulbus olfactorius auch durch einen Verlust an adulten neuronalen Vorläuferzellen aus der SVZ gekennzeichnet (Höglinger et al., 2004).

Die Gradierung der Krankheit erfolgt nach Braak et al. (2003). Gemäß der Braak-Klassifizierung werden Lewy Körperchen zunächst im Riechkolben und dem Hirnstamm mit Pontine tegmentum, Locus caeruleus und verlängertem Mark (*Medulla oblongata*) nachgewiesen. Mit dem Fortschreiten der Erkrankung werden Lewy Körperchen auch in der Substantia nigra, anderen Strukturen des Mittelhirns und dem basalen Vorderhirn detektiert. Zuletzt erreichen sie den Neokortex (Braak et al., 2003). Dieses Verteilungsmuster von fehlgefaltetem α -SYN Protein soll Ursache eines Prionen-ähnlichen Ausbreitungsmechanismus sein (George et al., 2013). Diese Übertragung kann sowohl von Zelle zu Zelle als auch auf weiter entfernte Ziele mittels axonalem Transports stattfinden. Erste Hinweise für diese Hypothese lieferte die Untersuchung von Hirngewebe von Patienten, denen embryonale neuronale Stammzellen als Ersatz des Verlustes dopaminergischer Neurone ins Striatum implantiert worden waren. Autopsische Untersuchungen der auf diese Weise behandelten Patienten zeigten eine α -SYN Pathologie in den transplantierten Nervenzellen. Dieses hat den Schluss nahe gelegt, dass eine direkte Übertragung des Proteins vom erkrankten Gehirn auf die neu eingepflanzten Zellen stattfindet (Kordower et al., 2008; Olanow und Brundin, 2012). Die zugrundeliegenden Mechanismen hinter Freisetzung, Transport und Wiederaufnahme von α -SYN sind jedoch bislang noch ungeklärt (George et al., 2013).

Morbus Parkinson ist die häufigste Bewegungsstörung, und nach Morbus Alzheimer die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung (Toda, 2007), die weltweit über 1,5% der Menschen mit über 65 Jahren betrifft (Huynh, 2011; Meissner et al., 2011), und aufgrund der wachsenden älteren Bevölkerung durch einen Trend in Richtung höherer Zahlen an Betroffenen gekennzeichnet ist. Die deutlich häufigere sporadische Form der Krankheit ist auch als idiopathischer Morbus Parkinson bekannt, da keine erkennbare Ursache vorliegt. Sie beginnt in der Regel zwischen 50 und 60 Jahren mit einer beträchtlichen Latenzperiode (Veldman et al., 1998). Dahingegen manifestiert sich die familiäre Form des Morbus Parkinson, der eine genetische Ursache zugrunde liegt, mit einer Häufigkeit von 10-15% deutlich früher (Farrer, 2006; Corti et al., 2011). Der wirtschaftliche Gesamtaufwand für die Krankheit beträgt jährlich in Europa rund 13,9 Milliarden Euro (Gustavsson et al., 2011), wobei pro Patient etwa 7.000 Euro pro Jahr für direkte medizinische Hilfe anfällt (Ehret et al., 2009). Diese Kosten übersteigen deutlich die

Aufwendungen für andere weit verbreitete Krankheiten, wie Krebs und Herz-Kreislauf-Erkrankungen (Gage et al., 2003). Neben dem hohen Leiden von Patienten und ihren Angehörigen macht diese große ökonomische Belastung für die gesamte Gesellschaft eine Entwicklung neuartiger Therapien dringend notwendig, die den Krankheitsverlauf abmildern (Chrischilles et al., 1998; Global Parkinson's Disease Survey, 2002; Ravina et al., 2007).

1.2.2 α -Synuklein - Struktur, Expression und physiologische Funktion

α -SYN ist ein kleines (40 kDa), 140 Aminosäuren langes, hoch-konserviertes präsynaptisches Protein des ZNS (Gai et al., 1999; Beyer, 2007), das etwa 0,5-1,0% des gesamten zytosolischen Proteinbestands ausmacht (Ding et al., 2002). Ursprünglich wurde α -SYN in den präsynaptischen Nervenendigungen des elektrischen Organs des leuchtenden kalifornischen Zitterrochens entdeckt, wo es mit cholinergen synaptischen Vesikeln assoziiert war (Maroteaux et al., 1988). Später wurde es auch in den präsynaptischen Endigungen des humanen Gehirns identifiziert, wodurch seine Kolokalisation mit synaptosomalen Membranen und synaptischen Vesikeln bestätigt wurde (Jensen et al., 1998). Zusätzlich zu seiner Lokalisation an der Synapse wird α -SYN im Nukleus nachgewiesen, eine Entdeckung, die die Bezeichnung 'Synuklein' entstammt (Maroteaux et al., 1988; Goncalves und Outeiro, 2013). Dabei wird die Verteilung von α -SYN und sein Eintritt in den Zellkern durch Interaktion mit Proteinen des Zellkerns oder Zellplasmas bestimmt (Kontopoulos et al., 2006).

α -SYN wird in drei überlappende Regionen eingeteilt: die N-terminale Region (As. 1-95) mit sieben sich wiederholenden Aminosäuresequenzen, die zentrale hydrophobe NAC-Region (engl. *non-amyloid beta component*; As. 60-95) und die saure C-terminale Region (As. 96-140) (Abbildung 1.5a,b), wobei die letzten beiden amphipatische Eigenschaften aufweisen (Beyer, 2007). Das α -SYN Protein zeichnet sich durch einen hohen Grad an struktureller Plastizität aus, die durch seine Umgebung beeinflusst wird. In Lösung besitzt α -SYN eine monomere und nativ ungefaltete Ringstruktur, wohingegen die N-terminale Region bei der Interaktion mit Phospholipidmembranen eine α -helikale Konformation annimmt (Weinreb et al., 1996; Lundvig et al., 2005). Diese Membranbindung ist vermutlich für die präsynaptische Lokalisation von α -SYN verantwortlich (Fortin et al., 2004).

Physiologisch besitzen α -SYN und die weiteren Mitglieder der Synukleinfamilie, β - und γ -SYN (Maroteaux und Scheller, 1991; Surguchov, 2013) eine wichtige Funktion bei der Erhaltung des Reservepools synaptischer Vesikel, der Vesikelhomöostase und synaptischen Neurotransmission (Murphy et al., 2000; Cabin et al., 2002; Burre et al., 2010; Nemani et al., 2010).

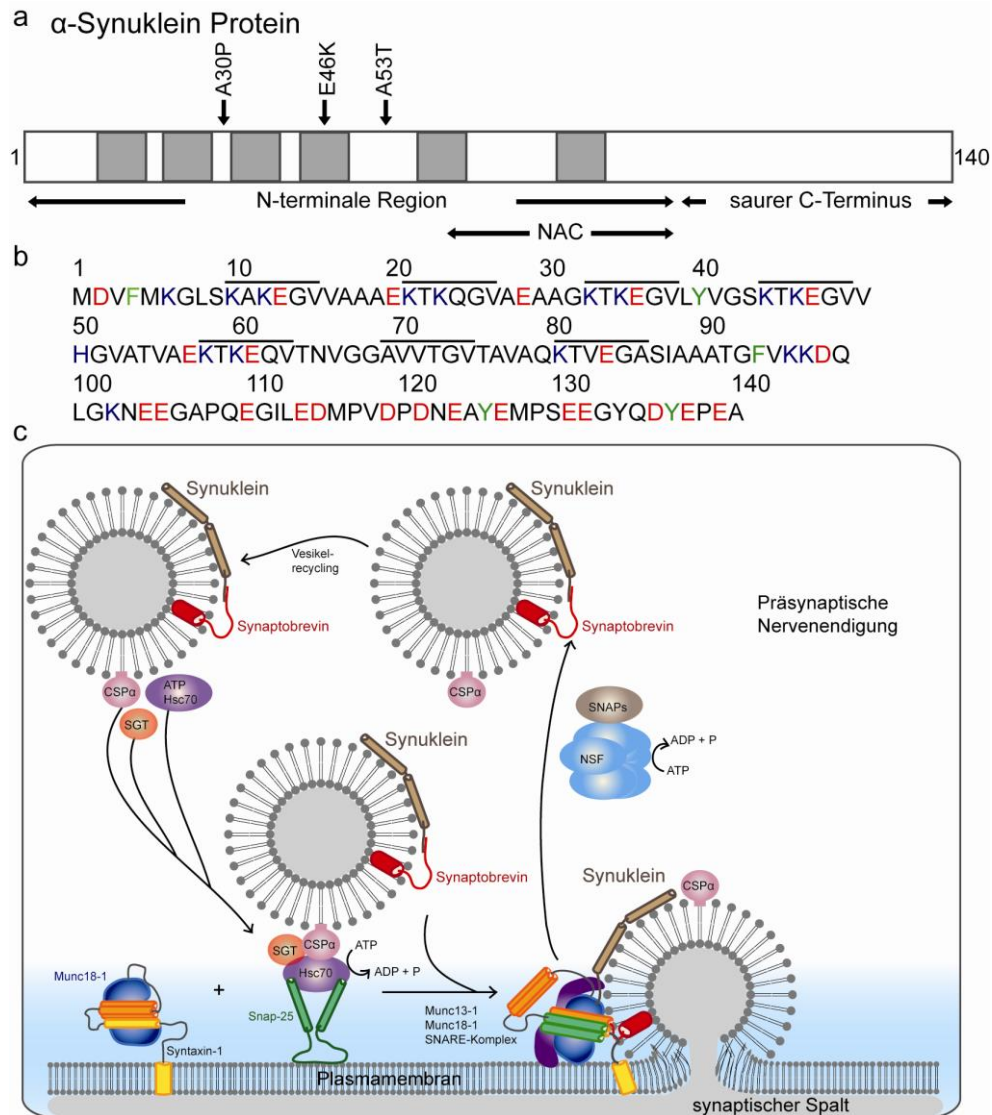


Abbildung 1.5: Sequenz, Struktur und postulierte Funktion des α-SYN Proteins an der Präsynapse. (a; nach Lundvig et al., 2005) α-SYN wird in drei sich überlappenden Regionen unterteilt: die N-terminale Domäne (As. 1-95, graue Boxen), die zentrale hydrophobe NAC-Region (As. 60-95) und die saure C-terminale Region (As. 96-140). Die drei α-SYN Punktmutationen befinden sich in der N-terminalen Region, die bei Bindung an Lipidmembranen eine α-Helix Struktur annimmt. (b; nach Lee et al., 2004) Die Aminosäuresequenz von α-SYN enthält sieben unvollständige Wiederholungen (unterstrichen; Konsensus XKTKEGVXXXX) im N-terminalen Bereich mit einem ähnlichen Motiv wie in Apolipoproteinen. Diese Ähnlichkeit indiziert, dass α-SYN in der Lage ist, reversibel an die Oberfläche von Lipidmembranen zu binden. Die mit der frühen Form des Morbus Parkinson assoziierten Punktmutationen A30P und A53T sind grau hinterlegt. Rote Aminosäuren sind sauer, blaue basisch und grüne aromatisch. (c; nach Rizo und Südhof, 2012) Überblick über die Funktion von Synuklein bei der Ausbildung von SNARE-Komplexen. Synuklein (braun) bindet an Synaptobrevin (rot) auf synaptischen Vesikeln. Syntaxin-1 (gelb) ist an der Plasmamembran verankert und bildet zunächst eine Konformation zur Bindung an Munc18-1 aus (blau). SNAP-25 (grün) bildet durch Interaktion mit Hsc70 und seinen Co-Chaperonen CSPα (rosa) und SGT (orange) einen SNARE-Komplex aus. Die Fusion von synaptischen Vesikeln bedarf den Zusammenbau des SNARE Komplexes (unten rechts), der zum Teil von Munc18-1 und Munc13-1 (lila) instrumentiert wird. Die Muncs kooperieren mit den SNAREs bei der Induktion der Membranfusion. Dabei assistiert Synuklein bei der Ausbildung des SNARE-Komplexes durch bislang unbekannte Interaktionen. Nach der Membranfusion wird der SNARE-Komplex durch NSF und SNAPs aufgetrennt, und Synaptobrevin wird in die Vesikelmembran integriert. CSP=Cystein String Protein; NSF=N-Ethylmaleimide sensibler Faktor; SGT=kleines Glutamin-reiches Protein; SNAPs=lösliche NSF Adaptorproteine; SNARE=SNAP Rezeptor; SNAP-25=Synaptosomen-assoziiertes Protein mit 25 kDa.

So reguliert α -SYN wichtige Schritte in der Dopaminhomeostase, indem es bei der Dopaminsynthese und Dopaminfreisetzung aus synaptischen Vesikeln (Yavich et al., 2004, 2005), sowie der Dopamintransporter-abhängigen Aufnahme von Dopamin beteiligt ist (Lee et al., 2001; Venda et al., 2010).

Die Freisetzung von Neurotransmittern aus präsynaptischen Nervenendigungen erfordert einen eng kontrollierten Membranfusionsmechanismus, dessen zentrale Komponenten die löslichen NSF anlagernden Proteinrezeptoren (engl. *soluble NSF attachment protein receptors*; SNARE) und Sec1/Munc18-ähnliche Proteine (Südhof und Rothman, 2009) darstellen. Mit einer Chaperon-ähnlichen Funktion haben Synukleine eine wichtige Rolle bei der Erhaltung des kontinuierlichen Aufbaus des SNARE-Komplexes an der Präsynapse, wobei α -SYN direkt an die SNARE-Proteine Synaptobrevin-2/VAMP2 bindet (Abbildung 1.5c; Burre et al., 2010). Da die Nervenendigungen ca. 1.000 mal pro Minute Neurotransmitter freisetzen, wobei jedes Mal SNAREs neu auf- und abgebaut werden müssen, werden gleichzeitig hohe Mengen an reaktiven ungefalteten intermediären SNARE-Proteinen gebildet, was die Präsynapsen anfällig für aktivitätsabhängige Degeneration macht (Kramer und Schulz-Schaeffer, 2007). Es wurde beispielsweise gezeigt, dass der Knockout des präsynaptischen Chaperonproteins Cystein String Protein α (CSP α) zu einem Untergang von Nervenzellen führt (Fernandez-Chacon et al., 2004). Interessanterweise kann diese letale, durch CSP α -induzierte Neurodegeneration durch eine Überexpression von α -SYN verhindert werden, während der zusätzliche Verlust von endogenem SYN diese noch verstärkt (Chandra et al., 2005). Folglich kompensiert α -SYN den Verlust an CSP α durch eine Steigerung der SNARE-Protein Funktion (Burre et al., 2010). Die Regulation der zellulären α -SYN Expression in Hirnregionen des Zebrafinken, die am Erlernen von neuen Liedern beteiligt sind (George et al., 1995), deutet außerdem auf eine spezifische Rolle von α -SYN bei der synaptischen Plastizität hin (Venda et al., 2010; Bendor et al., 2013). Bis heute sind jedoch weder die physiologische Funktion von α -SYN noch seine pathologische Rolle vollständig aufgeklärt (Masliah et al., 2000; Springer und Kahle, 2006; Bendor et al., 2013).

1.2.3 Rolle von α -Synuklein bei Morbus Parkinson - Proteinaggregation

α -SYN stellt als charakteristischer Bestandteil von Lewy Körperchen und Lewy Neuriten das wichtigste neuropathologische Kennzeichen der Parkinsonschen Krankheit dar. Punktmutationen im α -SYN Gen, Ala30Pro (A30P) und Ala53Thr (A53T), die mit der autosomal-dominant vererbten, frühen familiären Form des Morbus Parkinson assoziiert sind (Polymeropoulos et al., 1997; Krüger et al., 1998, Bussell und Eliezer, 2004), beschleunigen dabei die Umwandlung des Proteins in toxische oligomere Protofibrillen

(Conway et al., 2000; Soto, 2003). Dies geschieht, indem sie durch Veränderung der Aminosäuresequenz die Sekundärstruktur von Proteinen beeinflussen und diese anfälliger für Selbstaggregation und Ablagerung machen (Vogel, 1997).

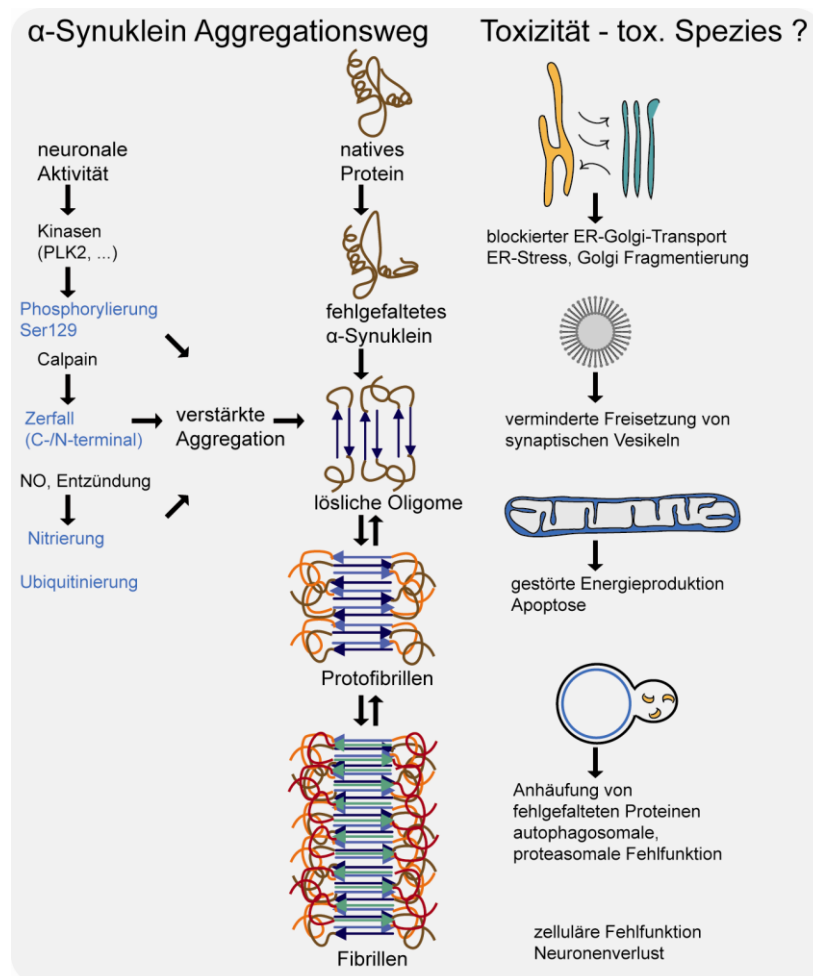


Abbildung 1.6: Proteinefehlfaltung, Aggregation und Toxizität. (mittig) α-SYN liegt in Lösung als natives, ungefaltetes Protein vor, das unter Ausbildung einer α-Helixstruktur auch an Membranen binden kann. Hochlösliche Proteinmonomere werden schrittweise in kleine Oligomere und weiter in unlösliche, faserartige Polymere mit einer charakteristischen gekreuzten β-Faltblattstruktur umgewandelt, die sich als fibrilläre, amyloide Aggregate im Zytoplasma von Neuronen ablagern. Die Ausbildung von Lewy Körperchen und Lewy Neuriten in einem Bruchteil der Nervenzellen wird als ein relativ spät eintretendes Ereignis verstanden. (links) Einige bekannte Modifikatoren des α-SYN Aggregationsprozesses. Elektrische Aktivität in Neuronen verändert die Assoziation von α-SYN mit Vesikeln, und stimuliert die Aktivität der Polylische Kinase 2 (PLK2), die α-SYN an Serin129 (Ser129) phosphoryliert. Eine Verstärkung der Aggregationseigenschaften von α-SYN wird neben dessen Phosphorylierung auch durch den Zerfall durch Proteasen (z.B. Calpaine) und der Nitrierung durch Stickstoffoxid (NO) und anderen reaktiven Stickstoffspezies, die bei Entzündungen vorkommen, bewirkt. Außerdem wird Ubiquitin als sekundärer Prozess in Lewy Körperchen abgelagert. (rechts) Fehlgefaltete Proteinspezies wirken neurotoxisch. Die α-SYN-vermittelte, zelluläre Toxizität betrifft unter anderem den ER-Golgi-Transport, die Exozytose von synaptischen Vesikeln, Mitochondrien und Lysosomen und andere proteolytische Bestandteile. Welche der fehlgefalteten Proteinspezies toxische Wirkungen aufweisen, ist noch unklar (Abbildung nach Soto, 2003; Forman et al., 2004; Cookson et al., 2009).

Darüber hinaus verdeutlicht der Nachweis von erhöhten α-SYN mRNA Spiegeln sowohl in Gehirnen von familiären und sporadischen Krankheitsfällen des Morbus Parkinson

(Rockenstein et al., 2001; Chiba-Falek et al., 2006) die zentrale Rolle von α -SYN in der Krankheitsentstehung. Außerdem kommt das Protein in pathologischen Läsionen in einer Gruppe von überlappenden neurodegenerativen Erkrankungen vor, unter anderem bei Multisystematrophie (MSA), kortikobasaler Degeneration, dem Steele-Richardson-Olszewski Syndrom (Wakabayashi et al., 1998; Spillantini et al., 1998) und bei der Amyotrophen Lateralsklerose (ALS) (Mezey et al., 1998).

Nach Soto (2003) werden lösliche monomere Proteine schrittweise in unlösliche, filamentöse Polymere umgewandelt, die in einer krankheits- und proteinspezifischen Weise akkumulieren (Abbildung 1.6). Diese neuropathologischen Veränderungen, die spontan, durch genetische Faktoren oder chemische/physikalische Trigger (z.B. Metallionen, pH-Wert Änderung, oxidativer Stress) ausgelöst werden, entwickeln sich über mehrere Jahre und Jahrzehnte und manifestieren sich klinisch meist im mittleren bis späten Alter (Soto, 2001). Der Mechanismus der Proteinaggregation folgt einem Seeding-/Keimbildungsprozess (Wood et al., 1999), der durch eine verzögerte Phase (Lag-Phase), eine Wachstumsphase und einen stationären Gleichgewichtszustand gekennzeichnet ist. Wenn eine kritische Konzentration an Proteinmonomeren überschritten wird, startet die Bildung von Oligomeren, der entscheidende Schritt für das weitere, schnelle Wachstum der Aggregate und der Bildung von langen Polymeren.

Sowohl die Komplexität neurodegenerativer Erkrankungen als auch die dynamische Natur der Proteinaggregation erschweren die Identifizierung eines eindeutigen pathogenen Agens bzw. Aggregats - Monomere, Oligomere oder fibrilläre Polymere - und dem zugrundeliegenden Mechanismus, der zum Nervenzelluntergang führt (Fink, 2006; Winner et al., 2011b). Zelltod durch α -SYN-induzierte Toxizität kann über drei unterschiedliche Mechanismen stattfinden, die bei neurodegenerativen Erkrankungen vermutlich kombiniert auftreten (Abbildung 1.6); (i) Verlust der biologischen Aktivität und Funktion nativer Proteine, (ii) Entzündung, vermittelt durch die Aktivierung von Astrozyten und Mikroglia, und (iii) Zunahme der Neurotoxizität durch fehlgefaltete und aggregierte Proteine (Soto, 2003; Cookson und van der Brug, 2008; Obeso et al., 2010). Dabei können intrazelluläre Aggregate die Zellen durch den Entzug von wichtigen, überlebensnotwendigen Faktoren oder durch die Produktion von oxidativem Stress schädigen, und damit die Oxidation von Proteinen und Lipiden, Erhöhung des intrazellulären Kalziums und Fehlfunktionen des endoplasmatischen Retikulums (ER), Golgiapparatus (Cooper et al., 2006) und von Mitochondrien (Smith et al., 2005) verursachen (Abbildung 1.6). Darüber hinaus können aggregierte Proteine Membranporen ausbilden und dadurch Zellen schädigen (Schmidt et al., 2013). Außerdem sind Störungen in den Proteinabbausystemen zur Beseitigung fehlgefalteter Proteine, dem zytosolischen UPS und dem Phagosom-Lysosom-System (PLS),

einschließlich Autophagozytose zu nennen (Rubinsztein, 2006; Foltynie und Kahan, 2013). Diese Kontrollmechanismen wirken der Aggregation von nicht-nativen und damit nicht-funktionellen Proteinen im Gehirn und anderen Organen entgegen, und verhindern dadurch Zellschäden und Apoptose. Der Neuronenverlust könnte beispielsweise durch die Bindung von aggregiertem α -SYN an Ubiquitin ausgelöst werden (Skovronsky et al., 2006), wodurch ein Proteinkomplex entsteht, der nicht ins Proteasom transportiert werden kann und deshalb in Form von zytoplasmatischen Einschlüssen aggregiert, den Lewy Körperchen. Um den noch unbekannten Wirkmechanismus der Zelltoxizität von aggregiertem α -SYN aufzuklären, sind dringend neue *in vivo* Modelle notwendig.

1.3 Adulte Neurogenese in Mausmodellen des Morbus Parkinson

Die Mehrzahl der transgenen Mausmodelle des Morbus Parkinson, die α -SYN unter der Kontrolle von verschiedenen Promotern exprimieren (Dawson et al., 2010), weisen zwar eine α -SYN Pathologie auf und zeigen spezifische, nicht-motorische funktionelle Defizite, zeigen aber keinen relevanten Verlust an dopaminergen Nervenzellen im nigrostriatalen System. Im Gegensatz zu den chemischen Mausmodellen des Morbus Parkinson, in denen dopaminerge Neurone nach Toxingabe absterben, wird deshalb in transgenen Tiermodellen keine wesentliche Beeinträchtigung der motorischen Eigenschaften beobachtet. Dennoch liefern sie einen wichtigen Einblick in α -SYN-assoziierte zelluläre und molekulare Mechanismen, die zur neuronalen Dysfunktion bei Parkinson beitragen.

Die adulte Neurogenese wurde in verschiedenen transgenen Mausmodellen des Morbus Parkinson untersucht (Abbildung 1.7), unter anderem in Mäusen, die humanes α -SYN bzw. A53T α -SYN unter der Kontrolle des PDGF β -Promoters (Masliah et al., 2000; Winner et al., 2004) oder CaMKII-Promoters (Lim et al., 2011) exprimieren. Außerdem wurden konditionale Mausmodelle zur Expression von humanem α -SYN bzw. A30P α -SYN unter Kontrolle des CaMKII-Promoters verwendet, welche eine vorübergehende Unterdrückung der Transgenexpression vor Analyse der adulten Neurogenese ermöglichen (Nuber et al., 2008; Marxreiter et al., 2009). PDGF β - α -SYN Mäuse zeigen eine unveränderte Zellproliferation in der SVZ bzw. Subgranularzone, weisen jedoch eine deutlich erniedrigte Überlebensrate von neugeborenen Zellen im Riechkolben und Hippocampus auf (Masliah et al., 2000; Winner et al., 2004). Da α -SYN unter dem PDGF β -Promoter sowohl in neuronalen Vorläuferzellen, als auch in Neuronen am Zielort überexprimiert wird, kann das vermehrte Absterben der Zellen sowohl auf zell-autonome als auch nicht-zell-autonome Effekte zurückzuführen sein. Spezifische, retroviral-vermittelte zell-autonome Überexpression des Proteins in Vorläuferzellen resultiert in einer verminderten Neubildung und Einwanderungsgeschwindigkeit der Zellen, ohne ihr

1 Einleitung

Überleben zu beeinflussen (Tani et al., 2010). Interessanterweise zeigen ältere Mäuse mit mutiertem α -SYN eine besonders ausgeprägte Beeinträchtigung der adulten Neurogenese (Winner et al., 2008), was auf eine zusätzliche Toxizität von A53T α -SYN während des Alterungsprozesses deutet. Mäuse, welche A53T α -SYN unter der Kontrolle des CaMKII-Promoters in Körnerzellen des Hippocampus exprimieren, zeigen eine verminderte Anzahl an adult-geborenen Körnerzellen nach 3 Wochen. Der Verlust an präsynaptischen Markerproteinen deutet auf eine synaptische Fehlintegration dieser neuen Zellen hin (Lim et al., 2011).

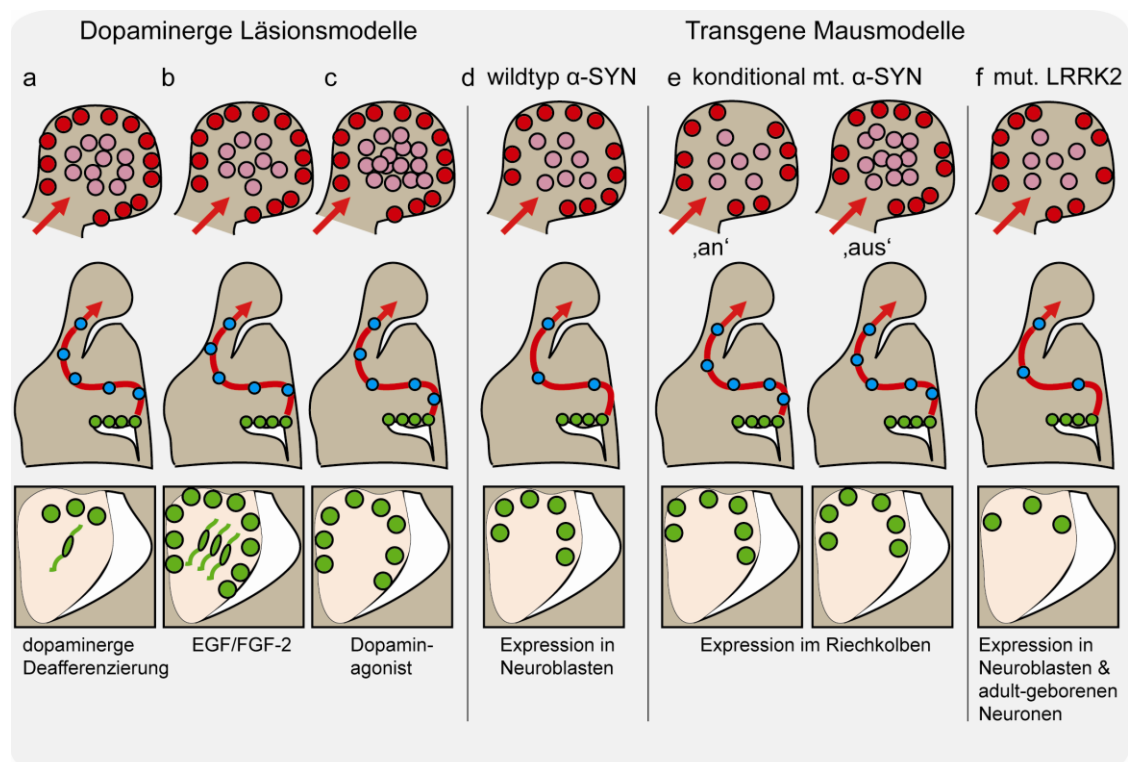


Abbildung 1.7: Adulte Neurogenese in Mausmodellen des Morbus Parkinson. (a-c; nach Marxreiter et al., 2013) Ergebnisse aus akuten dopaminergen Läsionsmodellen. (a) Dopaminerge Deafferenzierung führt zu einer verminderten Proliferation und einem Anstieg von neuen dopaminergen periglomerulären Neuronen. (b) Nach Stimulation mit dem epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) und dem Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF-2) wandern neugeborene Zellen in das angrenzende Striatum ein, was eine Verminderung der Anzahl von Körnerzellen im Riechkolben bei gleichbleibend erhöhter dopaminergischer Neurogenese bedingt. (c) Behandlung mit Dopaminagonisten führt zu einem Anstieg der Proliferation in der SVZ und einer erhöhten Anzahl an neuen Neuronen. (d-f) Ergebnisse aus transgenen Parkinson-Mausmodellen. (e) Die Expression von α -SYN in wandernden Neuroblasten resultiert in einer verringerten Anzahl an neuen periglomerulären Neuronen und Körnerzellen. (e) Expression von mutiertem α -SYN im Netzwerk des Bulbus olfactorius und in reifenden neugeborenen Nervenzellen führt zu einem verminderten Überleben von Körnerzellen und dopaminergen periglomerulären Neuronen. Die konditionale Unterdrückung der α -SYN Expression verbessert diese negativen Effekte. (f) In transgenen Mäusen mit LRRK2 Mutation werden Störungen in allen Stadien der adulten Neurogenese beobachtet.

Konditionale α -SYN Mausmodelle, die Tet-regulierbares α -SYN unter dem CaMKII-Promoter exprimieren, weisen im Alter eine nigrale und hippocampale Neurodegeneration, zusammen mit neurochemischen Veränderungen und

Bewegungsstörungen auf (Nuber et al., 2008). In Mäusen mit humaner A30P α -SYN Überexpression wird von einem verminderten Überleben adult-geborener Nervenzellen berichtet, das durch Unterdrückung der Transgenexpression ab der Geburt der Neurone verhindert werden kann (Nuber et al., 2008; Marxreiter et al., 2009). Diese Regulation korreliert direkt mit der erhöhten Anfälligkeit der neuen Neurone auf die Anwesenheit von A30P α -SYN. Zusätzlich wurden transgene Mäuse mit mutiertem LRRK2-Gen auf Veränderungen in der adulten Neurogenese untersucht (Winner et al., 2011). Dabei wurde gezeigt, dass die Mutation in der Serin-/Threoninkinase LRRK2, die eine wichtige Rolle bei dem Auswachsen von Neuriten, der Dendritogenese und der Orientierung von Axonen spielt (Sakaguchi-Nakashima et al., 2007), die dendritische Reifung von neugeborenen Neuronen erheblich beeinträchtigt (Winner et al., 2011). Insgesamt zeigen alle Studien einen schädlichen Effekt der Überexpression von (mutiertem) humanem α -SYN auf die neugeborenen Neurone während eines Abschnittes ihrer Lebensspanne (Proliferation, Migration, Reifung oder Integration). Dabei hängt die Toxizität maßgeblich vom Muster und Ausmaß der α -SYN Expression ab (Abbildung 1.7). Mögliche α -SYN-induzierte strukturelle Veränderungen der Neurone, inklusive zugrunde liegender Mechanismen und Faktoren, sind derzeit unbekannt.

1.4 Strukturelle Plastizität von dendritischen Spines

Bei den lichtmikroskopischen Untersuchungen von Gehirngewebe, das nach einem von Golgi beschriebenen Verfahren versilbert worden war, entdeckte der spanische Arzt Ramón y Cajal 1888 kleine, dornenartige Fortsätze an den neuronalen Dendriten, die er als Spines (span. *espinas*) benannte (Ramón y Cajal, 1888). Dendritische Spines stellen in der Regel das postsynaptische Kompartiment von glutamatergen Synapsen dar. In diesem findet man charakteristische proteinreiche, elektronendichte Strukturen, die sogenannten postsynaptischen Dichten. Diese liegen der aktiven Zone der Präsynapse gegenüber und setzen sich aus Neurotransmitter-Rezeptoren, signalvermittelnden Proteinen und Strukturproteinen zusammen (Nagata, 1989; Harris und Weinberg, 2012; Sheng et al., 2012).

In seltenen Fällen können sich innerhalb von dendritischen Spines sowohl Prä- und Postsynapse befinden, wie es beispielsweise in den plexiformen Schichten der Retina, den sensorischen und motorischen Nuklei des Thalamus, der Substantia gelatinosa des Rückenmarks (Shepherd et al., 2004) und den Körnerzellen des Riechkolbens der Fall ist (Price und Powell, 1970). Diese Spines dendrodendritischer Synapsen zeichnen sich deshalb durch ihren relativ großen Kopf mit GABAergen Effektorkomponenten und glutamatergen Rezeptorbestandteilen aus (Rall et al., 1966). In den Körnerzellspines des

1 Einleitung

Bulbus olfactorius werden über solche bilateralen, reziproken Synapsen mit den lateralen Dendriten von Mitralzellen (eine pro Spinekopf) Glutamatsignale aufgenommen und in einem schnellen Feedback-Mechanismus GABA-Transmitter freigesetzt. Dieser stellt die zelluläre Basis für die rückläufige und laterale Hemmung von Mitralzellen dar, die eine wichtige Rolle bei der Geruchsdiskriminierung einnimmt. Die Anzahl an dendritischen Spines auf Körnerzellendriten stellt somit ein direktes anatomisches Readout für die Anzahl an dendritischen Synapsen dar.

Die Körnerzellspines des Riechkolbens bestehen aus einem 0,5-2 μm großen Kopf, der meistens von einem Hals mit einer Länge von ca. 0,5-6 μm getragen wird (Woolf et al., 1991), und können mit mikroskopischen Methoden sehr gut erfasst werden (Abbildung 1.8a). Insgesamt sind die dendritischen Spines nicht gleichmäßig entlang des Dendriten verteilt und weisen unterschiedliche Abstände auf, die zwischen 0,5 und 3 μm betragen. Dendritische Spines lassen sich anhand ihrer unterschiedlichen Morphologie in kurze (*stubby*), dünne (*thin*) und pilzförmige (*mushroom*) Spines einteilen (Abbildung 1.8b; Harris et al., 1992; Material und Methoden, 4.4.2). Zusätzlich weisen einige Spines mehrfache Verzweigungen auf (*branched* Spines; Abbildung 1.8b; Woolf et al., 1991). Von den Spines abzugrenzen sind Filopodien, fadenförmige Ausstülpungen ohne Kopf, die vor allem in der postnatalen Entwicklungsphase Vorstufen von dendritischen Spines darstellen (Dailey et al., 1996; Matsutani und Yamamot, 2004).

Das Zytoskelett der Spines besteht hauptsächlich aus Aktinfilamenten (Hotulainen und Hoogenraad, 2010). Außerdem können sich in Spines endo- und exozytotische Bereiche (Newpher und Ehlers, 2009), Mitochondrien (Cameron et al., 1991; Li et al., 2004), Polyribosomen (Ostroff et al., 2002), ein glattes endoplasmatisches Retikulum (Segal et al., 2010) und ein Spineapparat (Hering und Sheng, 2001) befinden (Abbildung 1.8c). Mitochondrien werden beispielsweise für die Synthese von ATP für postsynaptische Funktionen benötigt (Cameron et al., 1991), weshalb sie sowohl im Spinehals als auch Spinekopf vorkommen und sich mobil zwischen beiden Kompartimenten bewegen können. Der Spineapparat könnte dabei die Wanderung der Mitochondrien auch in der Abwesenheit von Mikrotubuli erleichtern.

Der Begriff der strukturellen Plastizität umfasst alle Vorgänge, die mit der kinetischen Änderung von dendritischen Spines zusammenhängen. Diese beinhalten sowohl morphologische Modifikationen und Größenänderungen, als auch die Neubildung und den Verlust von dendritischen Spines. Beispielsweise führt eine hochfrequente Erregung der Präsynapse (LTP) zu einer Erhöhung des Spinevolumens, während eine niederfrequente Erregung (LTD) dessen Verminderung bewirkt (Matsuzaki et al., 2004). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass eine Reduktion der neuronalen Aktivität in einem Verlust von dendritischen Spines resultiert (Nägerl et al., 2004). Eine Neubildung

dendritischer Spines wird dagegen durch LTP-Stimulation induziert, wobei die Spines nach 15-19 h alle ultrastrukturellen Merkmale einer synaptischen Verbindung aufweisen (Nägerl et al., 2004, 2007). Da sich große Spines über die Zeit deutlich stabiler verhalten als kleine, ist es möglich, dass letztere ein strukturelles Korrelat des Lernens darstellen, die in Lernvorgängen in große Spines des Gedächtnisses überführt werden können (Bourne und Harris, 2007). Biochemisch betrachtet sind diese spezifischen Veränderungen an Spines, die aufgrund eines Stimulus aktiv waren, durch eine Erhöhung der Konzentration an Kalziumionen gekennzeichnet, die bei der synaptischen Plastizität eine zentrale Rolle spielen (Yuste und Denk, 1995). Außerdem korreliert die Spinegröße positiv mit der Anzahl an funktionellen AMPA-Rezeptoren in der postsynaptischen Dichte (Matsuzaki et al., 2001).

Eine besonders hohe strukturelle Plastizität wird in den reifenden und integrierenden Neuronen des Riechkolbens beobachtet (Abbildung 1.8d; Mizrahi, 2007). Der Spineumsatz von adult-geborenen Körnerzellen, der die Gesamtanzahl an neugebildeten und verlorenen Spines und damit die strukturelle Dynamik von Zellen ausdrückt (Holtmaat et al., 2009), erreicht Werte zwischen 30-40% pro Tag (Mizrahi, 2007; Kopel et al., 2012). Bereits sehr früh in der Entwicklung von adult-geborenen Körnerzellen werden GABAerge und glutamaterge Synapsen ausgebildet, die für die erfolgreiche Reifung, schnelle synaptische Integration und Funktion der neuen Zellen entscheidend sind (Panzanelli et al., 2009; Pallotto et al., 2012). Erst nach einer Woche entstehen reziproke Synapsen auf dem dendritischen Schaft, die weiter zur Bildung von Spines beitragen könnten (Panzanelli et al., 2009). Strukturelle Änderungen von Körnerzellspines wirken sich beträchtlich auf die Sensitivität von reziproken Synapsen mit Mitralzellen aus, und damit auf die laterale Hemmung im Riechkolben, wie eine biophysikalische Computersimulation nach Änderung des Durchmessers von Spinehals und Spinekopf zeigte (Antón et al., 1993).

Interessanterweise weisen die dendritischen Spines von neugeborenen Körnerzellen in laktierenden Müttern einen niedrigeren Umsatz, höhere Stabilität und geringere Dichte auf, unterscheiden sich morphologisch jedoch nicht von den Spines aus nicht-laktierenden Mäusen (Kopel et al., 2012). Zusammen mit einer höheren Dichte der präsynaptischen Bestandteile deuten diese strukturellen Veränderungen auf erhöhte integrative Eigenschaften der Neurone hin, die für eine verbesserte Geruchskodierung der jungen Mütter von Bedeutung sein könnten. In einer Umgebung mit limitierten Gerüchen wurde eine verminderte Spinedichte auf Körnerzelldendriten von Ratten beobachtet (Rehn et al., 1988). Zusätzlich wurde gezeigt, dass Nasenokklusion nicht nur zu einem verminderten Überleben von neugeborenen Körnerzellen führt, sondern auch deren Spinedichte drastisch beeinflusst (Saghatelyan et al., 2005). Als

1 Einleitung

kompensatorischer Effekt für die verminderte Anzahl an Spines wurde eine erhöhte Erregbarkeit der neuen Zellen mit erhöhtem GABA-Ausstrom beobachtet, was eine einzigartige adaptive Antwort darstellt, um die normale Funktion des Riechkolbens aufrecht zu erhalten.

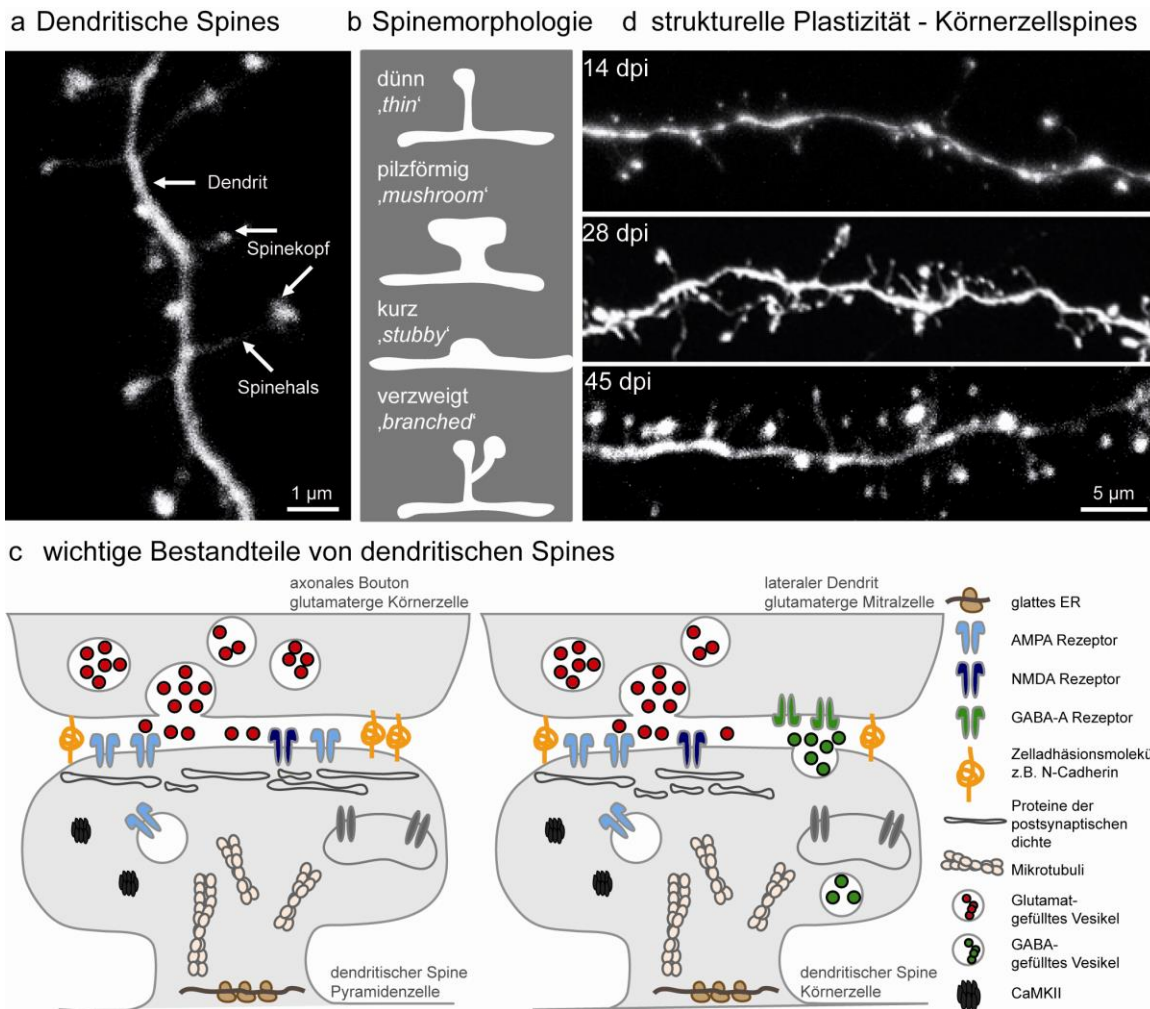


Abbildung 1.8: Strukturelle Plastizität von dendritischen Spines. (a) Spines eines Körnerzellsdendriten, der LV-eGFP exprimiert und mittels intravitraler Zwei-Photonen-Mikroskopie aufgenommen wurde. Spines tragen einen $0,01\text{--}0,8\text{ }\mu\text{m}^3$ großen Spinekopf und ca. $0,5\text{--}6,0\text{ }\mu\text{m}$ langen Spinehals, und kommen im ZNS von allen Wirbeltieren vor. (b) Spinemorphologien. Dendritische Spines werden aufgrund ihrer Form in verschiedene Klassen eingeteilt: dünne ('thin'), pilzförmige ('mushroom'), kurze ('stubby') und verzweigte ('branched') Spines. Sowohl Form, Größe als auch biochemische Besonderheiten der Spines beeinflussen die Signalübertragung an Synapsen. (c; nach Calabrese et al., 2006) Wichtige Spinebestandteile in Synapsen des Hippocampus (links) und Riechkolbens (rechts). In den meisten Fällen stellt die Zellmembran an der ausgestülpten Spinespitze ausschließlich eine postsynaptische Region dar (links). Aktionspotentiale des präsynaptischen Neurons führen im axonalen Bouton zum Einstrom von Ca^{2+} durch spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle, wodurch der erregende Neurotransmitter Glutamat freigesetzt wird. Bindung von Glutamat an ionotrophe AMPA-Rezeptoren bewirkt die Depolarisation der postsynaptischen Membran und Umwandlung des chemischen in ein elektrisches Signal. Glutamat-abhängige Aktivierung von NMDA-Rezeptoren bei gleichzeitiger Depolarisation der postsynaptischen Membran ermöglicht den Einstrom von Ca^{2+} , das eine Reihe von Veränderungen im Spine bewirkt und damit die Stärke der Postsynapse auf zukünftige Aktivierungen moduliert. Beispielsweise wird die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Protein-Kinase II (CaMKII) aktiviert, die die Leitfähigkeit der AMPA-Rezeptoren erhöht und zur Rekrutierung weiterer AMPA-Rezeptoren führt. Strukturproteine, wie PSD95, Homer und Shank bilden ein dichtes

Proteinnetzwerk, die postsynaptische Dichte. Zell-Adhäsionsproteine wie N-Cadherin, Integrin oder Neurexin/Neuregulin besitzen ebenfalls eine wichtige Funktion bei der Regulation der synaptischen Plastizität. Für die Form, Beweglichkeit und Stabilität von dendritischen Spines ist ein flexibles und regulierbares Aktin-Zytoskelett nötig, während langanhaltende postsynaptische Veränderungen über Transkription und Translation gespeichert werden. Von zentraler Bedeutung für die synaptische Plastizität ist Ca^{2+} , das intrazellulär im endoplasmatischen Retikulum (ER) gespeichert wird. Nur in wenigen Fällen beinhaltet der Spinekopf sowohl prä- als auch postsynaptische Bestandteile, beispielsweise in den dendrodendritischen reziproken Synapsen des Riechkolbens (rechts). Hier wird als direkte Folge des Ca^{2+} -Einstromes durch AMPA/NMDA-Rezeptoren GABA ausgeschüttet, was die rückläufige Selbsthemmung der glutamatergen Mitralzelle bewirkt. (d) Die strukturelle Plastizität von adult-geborenen Körnerzellen, die sich durch kontinuierliche Neubildung und Verlust von Spines mit Veränderungen der Spinemorphologien auszeichnet, ist besonders während der neuronalen Reifungs- und Integrationsphase erhöht, setzt sich aber bis ins hohe Neuronenalter fort. Während junge Neurone (14 Tage nach Geburt; 14 dpi) eine sehr geringe Spinedichte mit dünnen, unreifen Spines aufweisen, zeigen reife Neurone (28 dpi, 45 dpi) eine deutlich höhere Spinedichte und ausgereifte Spines: konfokale und *in vivo* zwei-photonen-mikroskopische Aufnahmen von LV-eGFP-exprimierenden adult-geborenen Körnerzellendriten.

1.5 Intravitale Untersuchungen mittels Zwei-Photonen-Mikroskopie

Die Mikroskopie stellt ein unverzichtbares Werkzeug für die Beschreibung von neurobiologischen Prozessen dar. Dabei sollten Neurone möglichst in funktionalem Zustand, ihrer natürlichen Umgebung und zeitabhängig beobachtet werden. Die Intravitalmikroskopie dient der Untersuchung von physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen im intakten Organismus über die Zeit (Pittet und Weissleder, 2011). Da sich lebendes Gewebe nicht gut für die direkte optische Analyse eignet, wurden verschiedene Methoden zur Fluoreszenzmarkierung entwickelt, welche die selektive und spezifische Detektion von Molekülen in niedrigen Konzentrationen mit einem hohen Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis durch Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht (Yuste, 2005). Für die Intravitaluntersuchung, bei der tief im Gewebe, mit hoher Auflösung, möglichst geringer Phototoxizität, hoher Sensitivität und oft über mehrere Zeitpunkte mikroskopiert wird, müssen dabei besondere Anforderungen erfüllt werden.

Als geeignete Methode für neurobiologische Untersuchungen hat sich die Zwei-Photonen-Mikroskopie erwiesen, die von Denk et al. (1990) erstmals für biologische Proben eingesetzt wurde. Der Zwei-Photonen-Anregung liegt ein nicht-linearer optischer Effekt zugrunde (Abbildung 1.9a), bei dem ein Atom durch Lichtquanten mit geringerer Energie als seiner Anregungsenergie auf ein höheres Energieniveau angeregt wird, sofern die Summe dieser Energien gleich der Anregungsenergie ist. Dabei müssen beide Photonen simultan auf das Atom oder Molekül treffen, was eine extrem hohe Photonendichte für messbare Ereignisse in absehbaren Zeitdimensionen erfordert. Demnach ist ein Zwei-Photonen-Ereignis deutlich unwahrscheinlicher als ein Ein-Photonen-Ereignis (Denk und Svoboda, 1997).

1 Einleitung

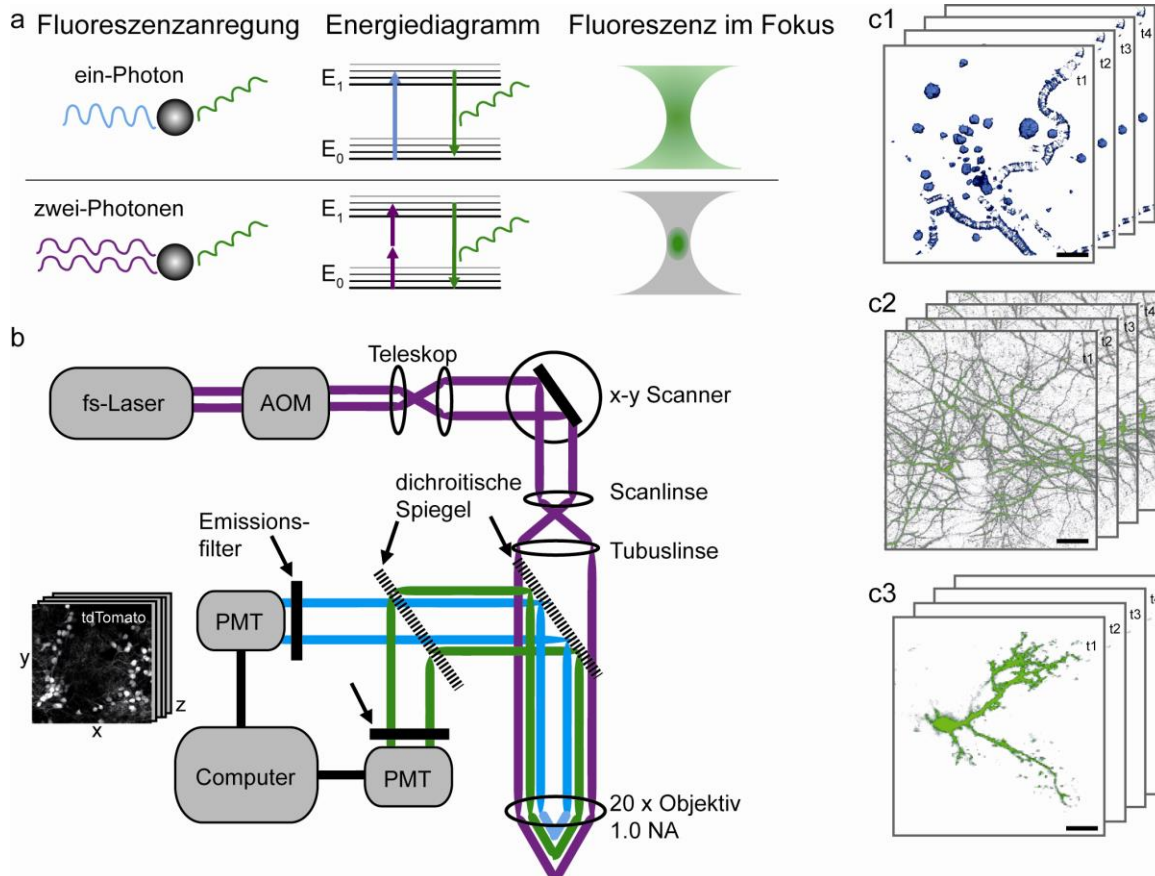


Abbildung 1.9: Prinzip der Zwei-Photonen-Mikroskopie zur Erzeugung dreidimensionaler Bildstapel. (a,b; nach Svoboda und Yasuda, 2006) (a) Schema der Fluoreszenzanregung durch ein oder zwei Photonen. Bei der Ein-Photonen-Anregung wird ein Lichtquant (blau) mit der entsprechenden Energie von einem Molekül (graue Kugel) absorbiert, die sich aus der Differenz der Energien des angeregten Niveaus E_1 und des Grundniveaus E_0 im vereinfachten Jablonski-Diagramm ergibt. Während die Ein-Photonen-Anregung im gesamten Lichtkegel eines fokussierten Lichtstrahles stattfindet (grün), werden bei der Zwei-Photonen-Anregung zum Überwinden der Energielücke zwischen E_0 und E_1 zwei Lichtquanten (magenta) mit halber Energie bzw. doppelter Wellenlänge genutzt (nicht-linearer Effekt). Der Einsatz von Femtosekunden-Lasern zur Erzeugung einer dazu benötigten extrem hohen Photonendichte ermöglicht die limitierte Anregung auf ein fokussiertes Volumen, in dem eine ausreichende Photonendichte existiert. (b) In der Anordnung der einzelnen Bestandteile unterscheidet sich ein Zwei-Photonen-Mikroskop von einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop in der Verwendung dieser Ultrakurzpuls-Laser mit typischem Anregungsspektrum von 700-1000 nm. Deren ausgestrahltes Licht wird mit einem akusto-optischen Modulator (AOM) angepasst, um Anregungsintensitäten zu kontrollieren. Der Laserstrahl wird von einem Teleskop aufgeweitet und nach dem Passieren der Scan- und Tubuslinse vom Objektiv in die Probe fokussiert. Durch Ablenkung an einem x-y Scanner kann die Position des Fokus in x-y Ebene verändert und Punkt für Punkt abgescannt werden. Anregungslicht und Fluoreszenzemission werden durch einen dichroitischen Spiegel voneinander getrennt, wobei das Licht auf verschiedene Detektoren (Photomultipliertubes, PMT) verteilt wird, vor denen jeweils ein Emissionsfilter zum Abblocken von restlichem Anregungslicht geschaltet ist. Durch die inhärente Bildung eines optischen Schnittes durch die Zwei-Photonen-Anregung in Kombination mit dem x-y Scannen entstehen dreidimensionale Bildstapel, die in (c) beispielhaft dargestellt sind. (c1) Methoxy-X04 gefärbte amyloide Plaques und amyloide Angiopathie in einer transgenen Alzheimermaus, (c2) GFP-fluoreszierende Axone und Dendriten im somatosensorischen Kortex einer GFP-M Maus und (c3) viral-transduziertes adult-geborenes Neuron, das im Riechkolben von einer lebenden Maus in einer Tiefe von 80 μm mikroskopiert wurde.

Die für die Intravitalmikroskopie wichtigen Vorteile der nichtlinearen Anregung gegenüber der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie bestehen insbesondere in dem langwelligeren Anregungslicht, das weniger stark von dem Gewebe absorbiert und

gestreut wird und damit eine höhere Eindringtiefe und geringere Phototoxizität aufweist (Svoboda und Yasuda, 2006). Außerdem erfolgt die Anregung in einem fokussierten, herdförmigen Volumen (Abbildung 1.9a), was die optische Schnittbildung mit einem sehr geringen Photobleichen außerhalb des Fokus ermöglicht. Die im Vergleich zur konfokalen Mikroskopie wesentlich höhere Detektionseffizienz in stark streuenden Proben resultiert daraus, dass vor allem in tiefen Geweben auch gestreute Photonen zum Signal beitragen können, sofern sie das Objektiv erreichen und passieren. Im Gegensatz dazu werden bei der konfokalen Mikroskopie keine gestreuten Photonen detektiert, da sie von der als Raumfilter fungierenden Lochblende vor dem Detektor abgeblockt werden. Der Aufbau eines Zwei-Photonen-Mikroskopes ist in Abbildung 1.9b dargestellt.

Für Intravitaluntersuchungen mittels Zwei-Photonen-Mikroskopie müssen die zu erforschenden biologischen Strukturen fluoreszieren. Eine Vielzahl von im Gewebe vorkommender Moleküle besitzt eine intrinsische Fluoreszenz, die direkt genutzt werden kann. Mittels intrazellulärer Stoffwechselprodukte, wie NADH (reduzierte Form von Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid), Flavinen oder Indolaminen können Rückschlüsse auf den Redox-Zustand einer Zelle gezogen werden (Takano et al., 2007). Außerdem kann der Kontrast von Kollagenfasern, Mikrotubuli und Skelettmuskeln durch Frequenzverdopplung, einen nicht-linearen optischen Effekt (SHG, *second harmonic generation*), verstärkt werden (Zipfel et al., 2003). Für kurzzeitige Experimente werden synthetische Fluoreszenzfarbstoffe ins Gehirn oder direkt in Zielzellen injiziert (Svoboda et al., 1997), wie z.B. Oregon Green 488 BAPTA-1 zur Messung von Kalziumsignalen (Garaschuk et al., 2006). In Langzeitexperimenten werden nur synthetische Fluoreszenzfarbstoffe verwendet, welche die Blut-Hirn-Schranke in ausreichenden Mengen passieren können. Dafür eignet sich Methoxy-X04 zur chronischen Untersuchung der Proteinaggregation von markiertem Amyloid β (A β) (Abbildung 1.9c1; Burgold et al. 2011). Standardmäßig werden auch fluoreszente Proteine eingesetzt, wie das grün-fluoreszierende Protein GFP (Parekh et al., 2013) oder spektrale Farbvarianten (XFPs), die durch Einfügen von Punktmutationen im GFP entstehen und verbesserte Fluoreszenzeigenschaften aufweisen (Shaner et al., 2005). In transgenen Mäusen, welche XFPs unter der Kontrolle des Neuronen-spezifischen Promotors Thy-1 exprimieren (Feng et al., 2000) kann die gesamte Neuronenstruktur inklusive dendritischer Spines *in vivo* mikroskopiert werden, wofür die GFP-M Linie aufgrund ihres spärlichen Expressionsmuster besonders gut geeignet ist (Abbildung 1.9c2). Neben transgenen Mäusen werden virale Vektorsysteme für die Expression von fluoreszierenden Proteinen, beispielsweise zur Messung von neuronaler Aktivität mithilfe der genetisch kodierten Ca^{2+} -Sensoren D3cpv (Wallace et al., 2008) und GcAMP (Tian

et al., 2009) eingesetzt. Dabei stellen die zeitlich und lokal terminierte Applikation und gezielte Expression der Zielkonstrukte durch spezifische Promotoren (Dittgen et al., 2004) bzw. die Ausstattung mit geeigneten viralen Oberflächenproteinen (Cronin et al., 2005) einen bedeutenden Vorteil dar. In dieser Arbeit wurden virale Vektorsysteme zur zeitlich terminierten Fluoreszenzmarkierung und chronischen Intravitalmikroskopie von adult-geborenen Neuronen in verschiedenen Reifungsstadien benutzt (Abbildung 1.9c; Mizrahi, 2007).

Für die *in vivo* Untersuchung des Gehirns mittels Zwei-Photonen-Mikroskopie muss ein optischer Zugang geschaffen werden. Dazu wird bei der *open-skull* Methode ein Stück Schädelknochen über der zu untersuchenden Region mit einem Durchmesser von 3-8 mm entfernt und für den Langzeitversuch durch ein Deckgläschen ersetzt (Svoboda et al., 1997; Holtmaat et al., 2009). Dieser optische Zugang erlaubt eine theoretisch unlimitierte Anzahl an Mikroskopiesitzungen mit Aufnahmen bis zu einer Tiefe von 350 µm im Bulbus olfactorius (Adam und Mizrahi, 2011) und 700-800 µm im Kortex (Fuhrmann et al., 2007). Die Operation induziert eine gliale Reaktion, die nach 3 Wochen weitestgehend abgeklungen ist (Holtmaat et al., 2009). Weniger invasiv ist die *thinned-skull* Methode, bei der der Schädel durch vorsichtiges Bohren bis auf eine etwa 20 µm dicke, durchsichtige Knochenschicht ausgedünnt wird (Yang et al., 2010). Eine kleine mikroskopierfähige Fläche (0,1-0,3 mm³) erlaubt allerdings nur oberflächliche Aufnahmen des Riechkolbens (Sawada et al., 2011) und Kortex (Holtmaat et al., 2009) in einem deutlich geringeren Zeitraum. Zusätzlich ist eine Kombination der beiden Methoden, bei der der ausgedünnte Schädelknochen durch ein Deckgläschen stabilisiert wird, möglich (Drew et al., 2010).

2 Ergebnisse

Im Ergebnisteil dieser Arbeit wurde zunächst die α -SYN Pathologie im Riechkolben des verwendeten transgenen Thy1-A30P α -SYN Mausmodells des Morbus Parkinson beschrieben und Veränderungen in der Riechfunktion der Tiere ermittelt. Anschließend wurden die Interneurone des Riechkolbens, die im Zuge der kontinuierlich stattfindenden Neurogenese in der adulten Maus gebildet werden, in A30P α -SYN und Wildtypmäusen untersucht. Dabei lag die Analyse der dendritischen Reifung, der funktionellen synaptischen Integration und des Überlebens der Nervenzellen im Interessenfokus. Als zentrales Ziel wurde der Einfluss der Überexpression von A30P α -SYN auf die strukturelle Plastizität von adult-geborenen Neuronen und ihren Synapsen überprüft. Dazu wurde die *in vivo* Zwei-Photonen-Mikroskopie in Kombination mit der zeitlich terminierten Injektion von lentiviralen Vektoren zur Transduktion der neugebildeten Zellen mit fluoreszierenden Proteinen eingesetzt. Diese Technik ermöglichte in der lebenden Maus eine detaillierte Untersuchung von Neuronen mit einem definierten Alter über mehrere Zeitpunkte. Durch die elektrophysiologische Charakterisierung der passiven Eigenschaften und synaptischen Aktivität der Neurone konnten funktionelle Störungen der sensiblen Neurone innerhalb des olfaktorischen Netzwerkes untersucht werden. Eine Therapiestudie mit einem anti-aggregativen Wirkstoff zielte schließlich darauf ab, den in A30P α -SYN Mäusen beobachteten neuronalen Schädigungen entgegenzuwirken.

2.1 Charakterisierung der Pathologie im Riechkolben

2.1.1 α -Synuklein Pathologie im humanen Riechkolben

Riechstörungen treten bei Parkinsonpatienten häufig als ein Frühsymptom noch vor den klassischen motorischen Beeinträchtigungen auf (Doty et al., 1989; Liberini et al., 2000). Während die Ursache der Motordefizite eine Konsequenz des Absterbens dopaminerge Neurone in der Substantia nigra ist, die in Verbindung mit der Ablagerung von α -SYN in diesen Neuronen steht (Spillantini et al., 1997; Sulzer, 2007), bleibt der Zusammenhang zwischen Riechstörung und α -SYN-Ablagerungen im Riechkolben und olfaktorischen Trakt (Braak et al., 2003) unklar. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Riechkolben von drei klinisch diagnostizierten Parkinsonpatienten (Brain Net; Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung) mikroskopisch untersucht. Die Charakterisierung der α -SYN Pathologie im humanen Riechkolben erfolgte durch immunhistologische Färbung von Paraffinschnitten mit einem Antikörper gegen humanes α -SYN, welcher

2 Ergebnisse

Lewy Körper und Lewy Neuriten markiert. Wie Abbildung 2.1 zeigt, wurden vereinzelt Lewy Körper in der Mitralzellschicht, der glomerulären Zellschicht und der inneren und äußeren Plexiformzellschicht nachgewiesen. Diese Befunde stimmen mit der Literatur überein, die von einer Lewy Pathology in Mitralzellen und der inneren plexiformen Zellschicht berichtet (Ubeda-Bañon et al., 2010). Für die weiteren Versuche dieser Arbeit wurden transgene Mäuse verwendet, die humanes mutiertes A30P α -SYN unter dem Neuronen-spezifischen Promoter Thy1 exprimieren (Kahle et al., 2000). Diese Mutation verursacht beim Menschen eine schwere familiäre Form des Morbus Parkinson mit frühzeitigem Krankheitsbeginn, indem sie die Bildung von toxischen Protein-Protofibrillen beschleunigt (Krüger et al., 1998; Conway et al., 2000). In dem Mausmodell wird A30P α -SYN zu seinem Wirkort an der Synapse transportiert, reichert sich jedoch aufgrund der Überexpression zusätzlich in den Zellkörpern des Gehirns an (Kahle et al., 2000)

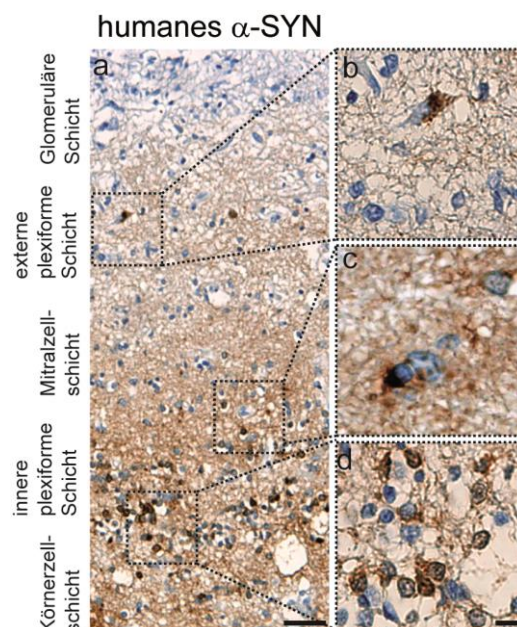


Abbildung 2.1: α -Synuklein Pathologie im humanen Riechkolben. (a) Übersicht über die Zellschichten des Riechkolbens in einem Paraffinschnitt aus dem Gehirn eines Parkinsonpatienten. Diese wurden freundlicherweise von Prof. Hans Kretschmar (BrainNet; Institut für Neuropathologie der Ludwig-Maximilians-Universität München) für die Aufnahmen zur Verfügung gestellt. Maßstab - 50 μ m. α -SYN-positive (α -SYN42; DAB) Proteinaggregate wurden vor allem in der (b) äußeren und (d) inneren plexiformen Schicht und in der (c) Mitralzellschicht nachgewiesen. Maßstab - 10 μ m.

2.1.2 α -Synuklein Pathologie im Riechkolben von transgenen A30P α -SYN Mäusen

Zur Charakterisierung der Neuropathologie im Riechkolben von 6 Monate alten A30P α -SYN Mäusen wurde die anormale Modifizierung und Aggregation von α -SYN immunhistologisch ausgewertet. Zusätzlich wurden die Tiere mittels Gersuchstests auf Veränderungen in der Riechfunktion untersucht. Die Färbung des Riechkolbens mit einem Antikörper gegen humanes α -SYN zeigte, dass das Protein in Neuronen des gesamten Bulbus olfactorius in hohen Mengen exprimiert wird, so auch in den drei

Hauptzellschichten: Glomeruläre Schicht, Mitralzellschicht und Körnerzellschicht (Abbildung 2.2a). Dabei wird laut Literatur eine doppelt so hohe Expression im Vergleich zu den endogenen α -SYN Spiegeln erreicht (Kahle et al., 2000). Während in anderen transgenen Mausmodellen, in denen α -SYN beispielsweise unter dem PDGF β -Promoter überexprimiert wird, erhöhte Proteinspiegel bereits in Neuroblasten und unreifen neugeborenen Zellen detektiert werden (Winner et al., 2004, 2008), beginnt die α -SYN Expression unter dem Neuronen-spezifischen Thy1-Promoter (Kahle et al., 2000) vergleichsweise spät. Durch den kombinierten immunhistologischen Nachweis von BrdU-markierten (Material und Methoden, Abbildung 4.9), adult-geborenen Nervenzellen und humanem A30P α -SYN konnte gezeigt werden, dass das mutierte menschliche Protein in geringen Mengen in den 32 Tage alten Zellen der glomerulären Schicht und Körnerzellschicht exprimiert wird (Abbildung 2.3). Das Fluoreszenzsignal für humanes α -SYN war in den neuen Zellen jedoch relativ schwach im Vergleich zu benachbarten, bereits vorhandenen Neuronen, die eine deutlich stärkere Färbung aufwiesen. In Wildtypkontrollen konnte kein humanes α -SYN nachgewiesen werden (Abbildung 2.3). Aufgrund der späten, Neuronen-spezifischen Proteinexpression stellt die A30P α -SYN Maus insbesondere ein geeignetes Modell für die Analyse der Reifung und Integration von adult-geborenen Neuronen im Riechkolben dar.

Das A30P α -SYN Protein wird posttranslational modifiziert (glykosyliert, nitriert, oxidiert oder phosphoryliert), was es anfälliger für die Bildung von Aggregaten und Fibrillen macht (Cookson et al., 2009; Soto, 2003). Um eine Form dieser pathologischen Proteinmodifizierung, die auch in höheren Mengen in Lewy Körpern und Lewy Neuriten im menschlichen Gehirn von Parkinsonpatienten vorkommt (Braithwaite et al., 2012; Wang et al., 2012), immunhistologisch nachzuweisen, wurde eine Färbung gegen phosphoryliertes α -SYN durchgeführt. Dieses wurde in den meisten Mitralzellen detektiert, wohingegen die glomeruläre Zellschicht und die Körnerzellschicht kein modifiziertes α -SYN aufwiesen (Abbildung 2.2b-e). Zusätzlich wurden die Riechkolben der A30P α -SYN Mäuse auf das Vorkommen von unlöslichem, fibrillärem α -SYN untersucht, das durch seine Beständigkeit gegen den enzymatischen Verdau mit Proteinase K (PK) charakterisiert ist. Diese Eigenschaft hat α -SYN mit fibrillärem A β , dem Hauptbestandteil von amyloiden Plaques bei Morbus Alzheimer, und der krankheitsassoziierten Variante des Prionenproteins, gemeinsam (Soto, 2003). Unlösliche Ansammlungen von humanem α -SYN wurden in einigen Neuronen der Mitralzellschicht (Abbildung 2.2f-i) und nur selten als subzelluläre Aggregate in der glomerulären Schicht und Körnerzellschicht nachgewiesen. Insgesamt spiegeln diese Befunde in transgenen A30P α -SYN Mäusen annäherungsweise die Situation in

2 Ergebnisse

Parkinsonpatienten wieder, die ebenfalls Lewy Körper und Lewy Neuriten in Mitralzellen aufweisen (Abbildung 2.1; Ubeda-Bañon et al., 2010).

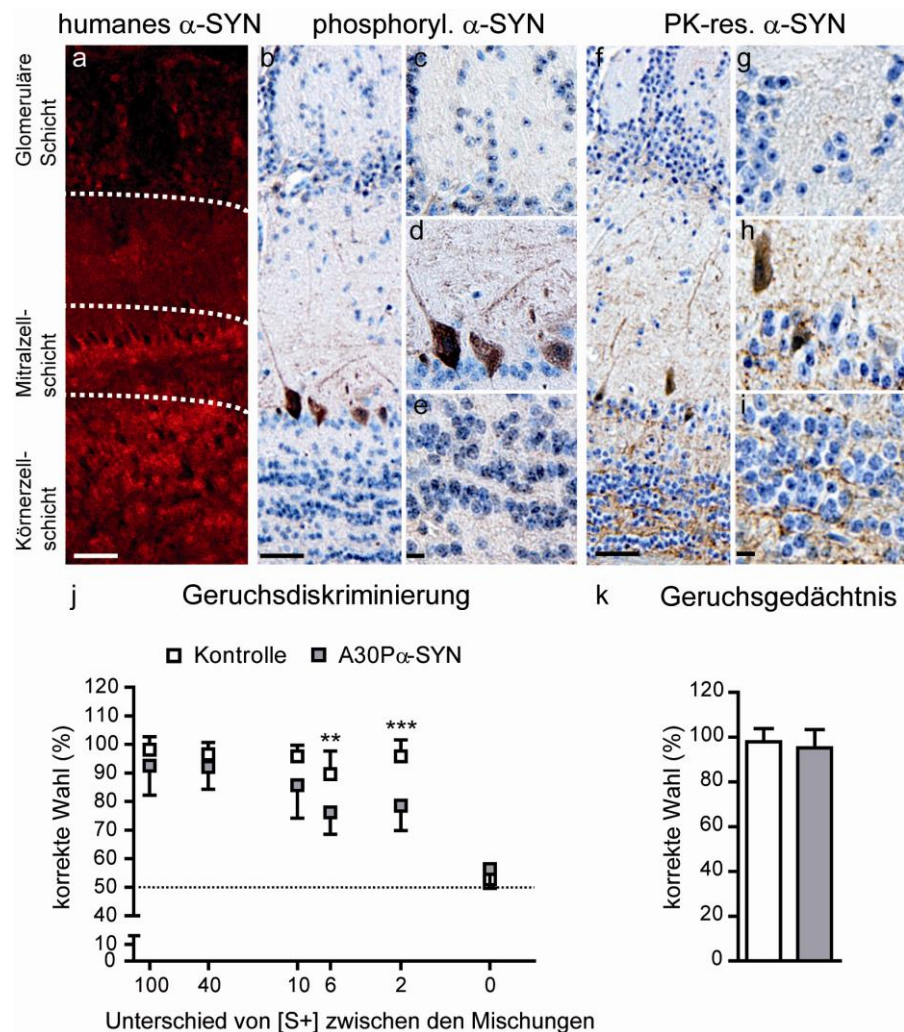


Abbildung 2.2: Charakterisierung der Pathologie im Riechkolben von transgenen A30P α-SYN Mäusen. (a) Immunfluoreszenz-Aufnahmen des Expressionsmusters von humanem A30P α-SYN (15G7, rot) unter der Kontrolle des Neuronen-spezifischen Thy1-Promoters im Bulbus olfactorius von 6 Monate alten transgenen Mäusen: z-Projektionen von konfokalen Bildstapeln. Maßstab - 50 µm. (b-e) Phosphoryliertes α-SYN (pSer129, DAB) als ein Marker für post-translationale Proteinmodifikation. (b) Verteilung von phosphoryliertem α-SYN in einem repräsentativen Schnitt des Riechkolbens: Maßstab - 50 µm, inklusive einer stärkeren Vergrößerung von (c) periglomerulären Zellen, (d) Mitralzellen und (e) Körnerzellen. Maßstab - 10 µm. Phosphoryliertes α-SYN wurde in den meisten Mitralzellen detektiert, während die glomeruläre Zellschicht und Körnerzellschicht kein modifiziertes α-SYN aufwies. (f) Fibrilläre Proteinaggregate wurden durch Proteinase K (PK) Verdau und anschließender Färbung mit humanem α-SYN-spezifischem Antikörper (15G7) nachgewiesen, wie ein repräsentativer Paraffinschnitt des Riechkolbens zeigt. Maßstab - 50 µm. (g-i) Beispiele stark vergrößerter Aufnahmen von α-SYN Aggregaten innerhalb der drei Zellschichten. Maßstab - 10 µm. Hinweis: Wenige Mitralzellen zeigten PK-resistente Ablagerungen. (j) Geruchsdiskriminierungstest. 6 Monate alte A30P α-SYN Mäuse und Wildtypkontrollen wurden verschiedenen binären Geruchsstoffmischungen vorgesetzt (z.B. 55% Apfel und 45% Erdbeere vs. 45% Apfel und 55% Erdbeere). Die Mäuse wurden konditioniert nur in der Schale mit mehr Apfelaroma zu graben (S⁺). Die korrekte Wahl von S⁺ (y-Achse) wurde gegen die verschiedenen Geruchsstoffpaare (x-Achse) aufgetragen. Mit zunehmender Ähnlichkeit der Mischungen sank die Leistung der Parkinsonmäuse (n=7) signifikant ab im Vergleich zu den Kontrollen (n=8 Mäuse). (k) Das Geruchsgedächtnis war nicht betroffen. Werte sind als Mittel ± SD dargestellt. **p<0,01; ***p<0,001; zweifaktorielle Varianzanalyse mit Bonferroni post-hoc Test.

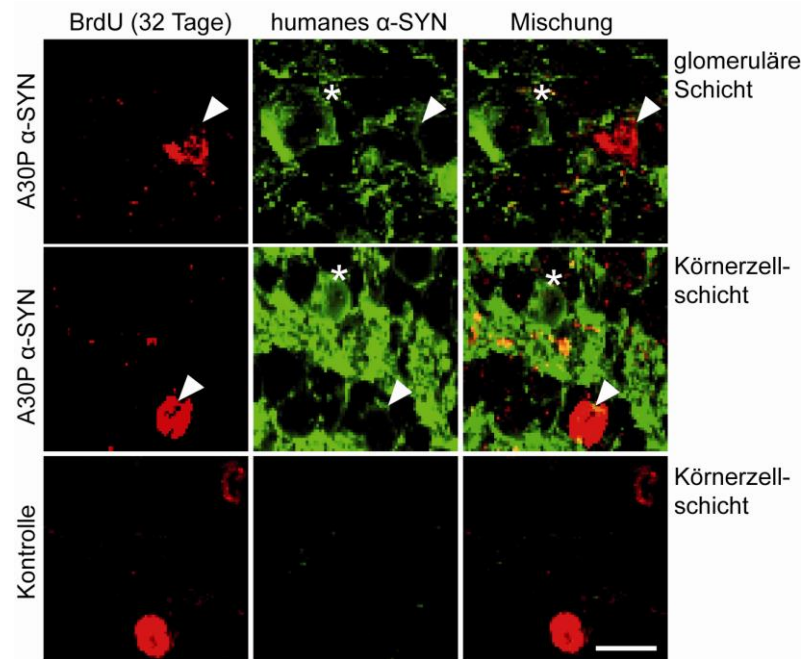


Abbildung 2.3: Expression von humanem A30P α -SYN in adult-geborenen Neuronen. Proteinexpression von humanem A30P α -SYN in 32 Tage alten adult-geborenen Neuronen unter Kontrolle des Neuronen-spezifischen Thy1-Promoters in transgenen A30P α -SYN Mäusen: z-Projektionen von konfokalen Bildstapeln. Maßstab - 10 μ m. Adult-geborene Neurone (BrdU, rot) der glomerulären Schicht und der Körnerzellschicht waren relativ schwach positiv für humanes α -SYN (15G7, grün). Weiße Pfeile deuten auf doppelt-positive Zellen. Im Vergleich zeigten einige benachbarte, bereits vorhandene Zellen des Netzwerkes ein deutlich höheres Signal für humanes α -SYN (weiße Sterne). In Wildtypkontrollen konnte kein humanes α -SYN nachgewiesen werden.

2.1.3 Testung der Geruchsdiskriminierung und des Geruchsgedächtnisses

Im nächsten Schritt wurde geprüft, ob die immunhistologisch bestimmte Neuropathologie im Bulbus olfactorius die Riechleistung der transgenen A30P α -SYN Mäuse beeinflusst. Mit Hilfe einer einfachen Testbatterie wurde ein Geruchstest durchgeführt (Material und Methoden, Abbildung 4.8), der den Nachweis von subtilen Unterschieden in der Geruchsdiskriminierung ermöglicht und zudem eine Bewertung des olfaktorischen Langzeitgedächtnisses zulässt (Mihalick et al., 2000; Glasl et al., 2012).

In dem Test mussten 6 Monate alte Parkinson- und Wildtypmäuse zwischen zunehmend ähnlicheren Lösungen unterscheiden, die aus einer Mischung von zwei verschiedenen Geruchsstoffen (Apfel, Erdbeere) mit einem Unterschied von 100% bis nur 2% bestand. In der Trainingsphase des Testes wurden die Mäuse auf einen der beiden Geruchsstoffe (Apfel, S⁺) konditioniert, indem das Graben der Maus in dem S⁺ angereicherten Schälchen belohnt wurde. Bis zu einem 10%igen Unterschied zwischen den beiden Geruchsstoffmischungen (55% S⁺ und 45% S⁻; *vice versa*), entsprach die Leistung der A30P α -SYN Mäuse, im richtigen Schälchen zu graben, die der Kontrollmäuse (Abbildung 2.2j). Binäre Mischungen mit nur 6%igem Unterschied (53% S⁺ und 47% S⁻; *vice versa*) dagegen zeigten erste Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen.

Hier sank die Leistung der Parkinsonmäuse ($75 \pm 8\%$ richtige Wahl; $n=7$) signifikant ab im Vergleich zur Kontrolle (Wildtyp; $89 \pm 8\%$ richtige Wahl; $n=8$; $p < 0,01$). In der nächsten Schwierigkeitsstufe stieg der Unterschied zwischen beiden Genotypen weiter an. Während die Kontrollgruppe eine Geruchsstoffmischung mit nur 2%igem Unterschied ($51\% S^+$ und $49\% S^-$; *vice versa*) in $93 \pm 8\%$ der Versuche diskriminieren konnten, war in den Parkinsonmäusen nur in $79 \pm 9\%$ der Versuche ein Erfolg zu verzeichnen ($p < 0,001$). Eine 50%ige binäre Mischung konnte von beiden Gruppen gleichermaßen schlecht unterschieden werden, da sich der prozentuale Anteil einer korrekten Wahl an ein Erfolgsniveau von 50% annäherte (Zufallsentscheidung). An dieser Stelle ist es wichtig zu erwähnen, dass das Lernverhalten von A30P α -SYN Mäusen während der Trainingsphase nicht vom Wildtyp abwich (mittlere Erfolgsrate von $90 \pm 8\%$ in beiden Gruppen; $p > 0,05$). Insgesamt zeigen diese Testergebnisse, dass 6 Monate alte A30P α -SYN Mäuse mit pathologischen Proteinansammlungen in Mitralzellen eine Beeinträchtigung der Diskriminierung von sehr feinen Geruchsdifferenzen aufweisen, während ihre generelle Geruchsunterscheidung noch funktioniert.

Um einen möglichen Einfluss der α -SYN Pathologie auf das Geruchsgedächtnis zu prüfen, wurden die Mäuse 2 Monate später erneut mit den beiden Geruchsstoffen konfrontiert. Beide Gruppen erinnerten sich gleichermaßen an den Test ($p > 0,05$; Studentischer *t*-Test), was gegen eine Störung des olfaktorischen Langzeitgedächtnisses in den Parkinsonmäusen spricht (Abbildung 2.2k). Insgesamt zeigen diese Ergebnisse einen nachteiligen Effekt der Überexpression von A30P α -SYN auf die Riechleistung der transgenen Mäuse, die deshalb ein geeignetes Modell für die Untersuchung von α -SYN-induzierten strukturellen Veränderungen in frühen Stadien der Parkinsonschen Erkrankung darstellen.

2.2 Analyse von Untergruppen der periglomerulären Neurone in A30P α -SYN Mäusen

Die Trennung der Geruchsinformation auf der Ebene der olfaktorischen Sensorneurone (OSN) und Glomeruli wird als erster fundamentaler Schritt in der Geruchsdiskriminierung angesehen (Shepherd et al., 2007; Lledo et al., 2005). Um aufzuklären, welche chemischen Subtypen von periglomerulären Neuronen sensibel auf die α -SYN Ablagerungen reagieren, wurden drei Untergruppen, die entweder Calretinin (CR), Calbindin (CB) oder Tyrosinhydroxylase (TH) exprimieren (Kosaka und Kosaka, 2007), genauer untersucht. Diese Zellen zeigen zum Großteil auch einen GAD/GABAergen Phänotyp (Einleitung, Abbildung 1.2). Darüber hinaus existiert ein beträchtlicher Anteil an GAD/GABAergen Zellen, die zusätzlich andere chemische Marker aufweisen (Kosaka

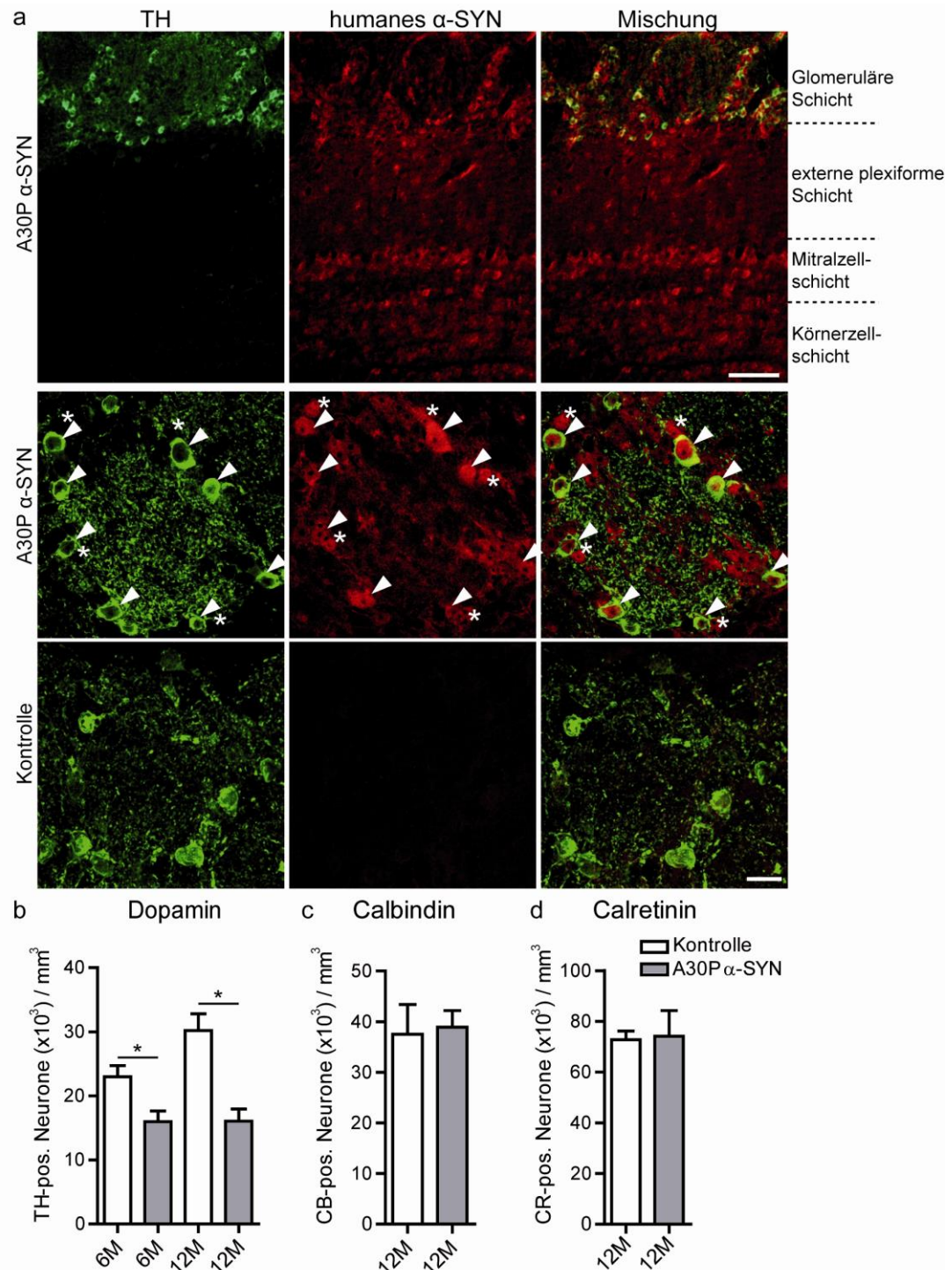


Abbildung 2.4: Erhöhte Anfälligkeit von dopaminergen Neuronen in A30P α -SYN Mäusen. (a) Immunfluoreszenz Aufnahmen der Expression von Tyrosinhydroxylase (TH, grün) und humanem α -SYN (15G7, rot) in den unterschiedlichen Zellschichten des Riechkolbens in A30P α -SYN Mäusen: z-Projektionen von konfokalen Bildstapeln. Maßstab - 50 μ m. Hinweis: Vorkommen von dopaminergen Nervenzellen ist auf die glomeruläre Zellschicht begrenzt. Unter stärkerer Vergrößerung eines Glomerulus ist die Ablagerung von A30P α -SYN in dopaminergen Neuronen (weiße Pfeile) und anderen Subtypen (weiße Sterne) sichtbar. Maßstab - 10 μ m. (b) Quantifizierung der Gesamtzahl an TH-positiven Neuronen pro mm^3 in 6 und 12 Monate alten Kontrolle (Wildtyp; n=4) und A30P α -SYN Mäusen (n=4). Quantifizierung von (c) Calbindin (CB)- und (d) Calretinin (CR)-positiven Neuronen in 12 Monate alten Kontrolle (Wildtyp) und A30P α -SYN Mäusen. * $p < 0,05$; Studentscher t -Test.

et al., 1998). Aufgrund der großen Heterogenität von Interneuronen sind bis heute noch nicht alle Subtypen identifiziert und ihre prozentualen Anteile umstritten (Hack et al., 2005; Kosaka und Kosaka, 2007; Ninkovic et al., 2007; Batista-Brito et al., 2008; Adam und Mizrahi, 2011; Kosaka und Kosaka, 2013). Deshalb wurden nur einige Untergruppen an periglomerulären Neuronen von der Analyse erfasst.

In der glomerulären Schicht der A30P α -SYN Mäuse wurde humanes α -SYN - gefärbt mit dem 15G7-Antikörper - sowohl in TH-positiven, dopaminergen Neuronen als auch in anderen Phänotypen nachgewiesen (Abbildung 2.4a). Anhand von spezifischen Antikörperfärbungen gegen TH, CR und CB wurde anschließend die mittlere Anzahl an Marker-positiven Nervenzellen pro mm³ Riechkolben bestimmt. Sechs und 12 Monate alte transgene Mäuse zeigten eine signifikant erniedrigte Anzahl an dopaminergen Neuronen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Wildtyp) gleichen Alters (Abbildung 2.4b). Der Unterschied betrug ca. 30% in 6 Monate alten A30P α -SYN Mäusen (16.000 ± 1.700 vs. 23.000 ± 1.700 ; n=4 Mäuse pro Gruppe; p<0,05) und stieg auf 47% in 12 Monate alten Tieren an (16.100 ± 1.900 vs. 30.200 ± 2.600 ; n=3 Mäuse pro Gruppe; p<0,05). Während die Dichte an dopaminergen Neuronen in den transgenen Mäusen in beiden Altersstufen auf einem ähnlichen Level blieb (p>0,05), war mit zunehmendem Alter der Wildtypmäuse ein klarer Trend in Richtung einer steigenden Gesamtanzahl an TH-positiven Neuronen erkennbar (p=0,06), der mit der Literatur übereinstimmt (Adam und Mizrahi, 2011). Die Gesamtanzahl an CR- und CB-positiven periglomerulären Neuronen war unverändert in den Parkinsonmäusen (Abbildung 2.4c,d; p>0,05). Diese Ergebnisse deuten auf eine generelle Sensitivität von dopaminergen periglomerulären Neuronen auf eine A30P α -SYN Überexpression im murinen Riechkolben.

2.3 Quantitative Bestimmung des Überlebens von adult-geborenen Neuronen im Riechkolben von A30P α -SYN und α -SYN KO Mäusen

Jeden Tag integrieren neue Interneurone - periglomeruläre Neurone und Körnerzellen - in das bestehende Netzwerk, um die Funktion des Riechkolbens aufrechtzuerhalten (Lledo et al., 2006; Whitman und Greer, 2009; Lazarini und Lledo, 2011). Die Zeitspanne der neuronalen Reifung, Differenzierung und synaptischen Integration innerhalb des Bulbus olfactorius beträgt ca. 10-60 Tage (Lledo et al., 2005) und beinhaltet die kritische Phase (14-28 Tage), in der etwa die Hälfte der neugeborenen Zellen natürlicherweise absterben (Yamaguchi und Mori, 2005; Kelsch et al., 2009). Während dieser Periode wird ihr Überleben von extrinsischen Modulatoren kritisch beeinflusst (Petrenau und Alvarez-Buylla, 2002; Alonso et al., 2006; Mandaïron et al., 2006).

Um den Einfluss von Thy1-A30P α -SYN Überexpression auf das Überleben von adult-geborenen Nervenzellen nach der kritischen Phase zu untersuchen, wurden Injektionen mit Bromdesoxyuridin (BrdU) durchgeführt (Abbildung 2.7a; Material und Methoden, Abbildung 4.9). BrdU wird während der Zellteilung in die neu synthetisierte DNA integriert, wodurch die Nuklei von proliferierenden bzw. neugeborenen Zellen detektiert werden können.

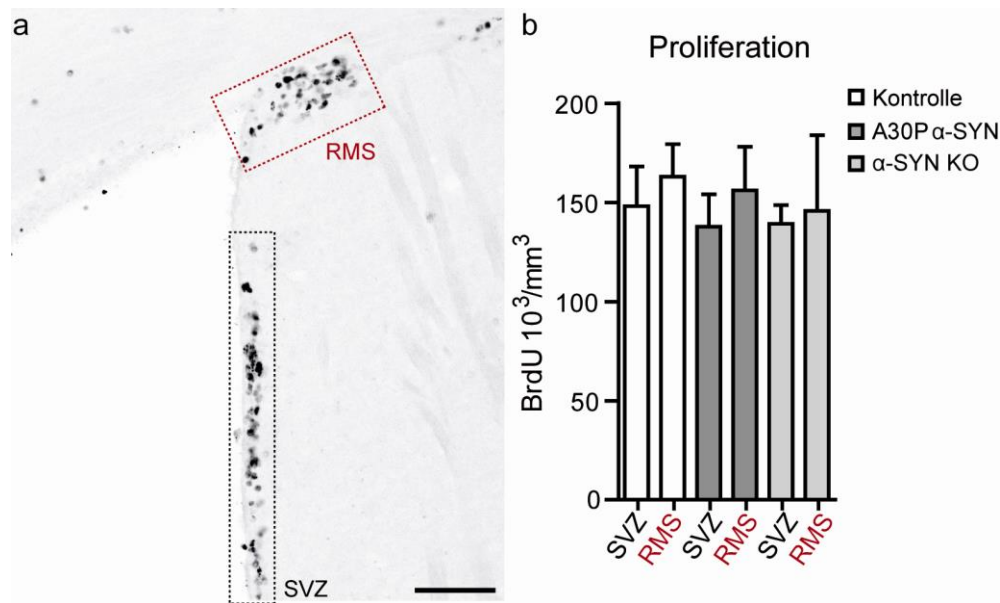


Abbildung 2.5: Unveränderte Zellproliferation in A30P α -SYN Mäusen. (a) Repräsentative immunhistochemische Färbung von neugeborenen Zellen (BrdU, schwarz) in der SVZ und dem RMS von Wildtymäusen: z-Projektion von konfokalen Bildstapeln. Maßstab - 100 μ m. (b) Quantitative Analyse der BrdU-positiven, neugeborenen Zellen pro mm³ SVZ bzw. RMS in 6 Monate alten Kontrolle (Wildtyp; n=3), A30P α -SYN (n=3) und α -SYN KO Mäusen (n=3). Einfaktorielle Varianzanalyse mit Tukey-Kramer post-hoc Test.

Da sich eine reduzierte Proliferationsrate auch in verminderten Neuronenzahlen im Riechkolben, d.h. in einer reduzierten Überlebensrate der neuen Zellen, widerspiegeln würde, wurde zunächst die Zelldichte innerhalb von SVZ und RMS 24 h nach BrdU-Injektion bestimmt (Abbildung 2.5; Material und Methoden, Abbildung 4.9). In allen drei Versuchsgruppen - A30P α -SYN, α -SYN Knockout (KO; Abeliovich et al., 2000) und Kontrolle (Wildtyp) wurde in der SVZ eine geringfügig niedrigere Dichte detektiert, die jedoch nicht signifikant von der im RMS abwich ($p > 0,05$). Zwischen den verschiedenen Testgruppen war kein signifikanter Unterschied in der Proliferation in der SVZ (148.000 ± 35.000 Zellen/mm³ in n=3 Kontrolle; 138.000 ± 28.300 Zellen/mm³ in n=3 A30P α -SYN; 139.000 ± 16.400 Zellen/mm³ in n=3 α -SYN KO Mäusen; $p > 0,05$) bzw. dem RMS (163.000 ± 28.200 Zellen/mm³ in n=3 Kontrolle, 156.000 ± 38.000 Zellen/mm³ in n=3 A30P α -SYN; 146.000 ± 91.300 Zellen/mm³ in n=3 α -SYN KO Mäusen; $p < 0,05$) messbar (Abbildung 2.5). Diese Ergebnisse zeigen, dass weder die Thy1-regulierte

2 Ergebnisse

Überexpression von A30P α -SYN noch das Fehlen von α -SYN die Proliferation von neuen Zellen beeinflusst.

Auf der Basis dieser Erkenntnis wurden anschließend mittels BrdU-Injektionen alle Nervenzellen erfasst, die innerhalb von 5 Tagen in der SVZ und dem RMS geboren wurden, im Riechkolben zu Neuronen ausdifferenzierten (NeuN-positiv), und mindestens einen Monat in der glomerulären Schicht (Abbildung 2.6) bzw. der Körnerzellschicht (Abbildung 2.7) überlebten.

2.3.1 Periglomeruläre Neurone

Im Riechkolben von 6 Monate alten A30P α -SYN Mäusen wurden 50% weniger neugeborene periglomeruläre Nervenzellen im Vergleich zur Kontrolle (Wildtyp) ermittelt ($0,9 \pm 0,01\%$; $n=6$ vs. $1,8 \pm 0,3\%$ BrdU/NeuN; $n=5$ Mäuse; $p < 0,05$; Abbildung 2.6b). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass A30P α -SYN das Überleben der dopaminergen adult-geborenen Nervenzellen beeinträchtigt, die in den Parkinsonmäusen um 33% reduziert waren ($27,7 \pm 3,8\%$; $n=4$ vs. $41,6 \pm 3,4\%$; $n=3$ Mäuse; $p < 0,05$; Abbildung 2.6a,c).

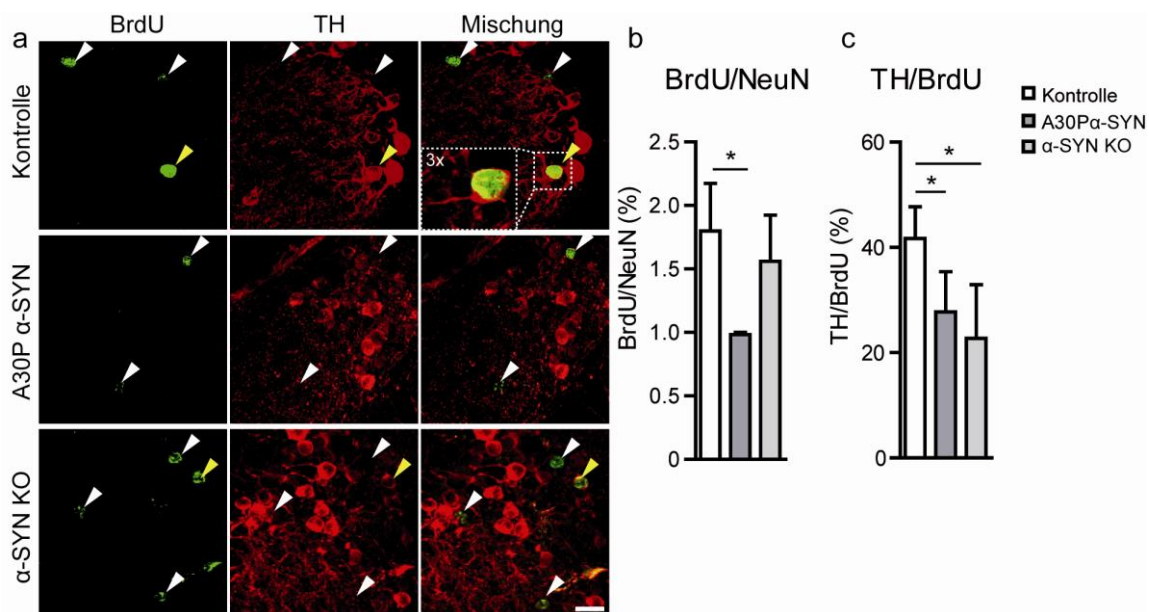


Abbildung 2.6: Vermindertes Überleben von adult-geborenen periglomerulären Neuronen in A30P α -SYN Mäusen.

(a) Immunfluoreszenz-Aufnahmen von adult-geborenen (BrdU, grün) dopaminergen (TH, rot) Neuronen in 6 Monate alten Kontrolle (Wildtyp), A30P α -SYN und α -SYN KO Mäusen: z-Projektionen von konfokalen Bildstapeln stellen Beispiele für eine mögliche Verteilung von doppelt-positiven Zellen (BrdU/TH; gelbe Pfeile) dar. Maßstab - 10 μ m. (b) Quantifizierung des Anteils an adult-geborenen Neuronen (BrdU/NeuN) in der glomerulären Schicht von 6 Monate alten Kontrolle (Wildtyp; $n=4$), A30P α -SYN ($n=3$), und α -SYN KO Mäusen ($n=5$). (c) Quantifizierung des Anteils an dopaminergen adult-geborenen Neuronen (TH/BrdU) in Kontrolle (Wildtyp; $n=4$), A30P α -SYN ($n=3$) und α -SYN KO Mäusen ($n=5$). * $p < 0,05$; einfaktorielle Varianzanalyse mit Tukey-Kramer post-hoc Test.

Diese Befunde in den Thy1-A30P α -SYN Mäusen sind mit Studien in anderen Parkinsonmodellen vergleichbar, die beispielsweise α -SYN unter dem PDGF β -Promoter

(47% Reduktion; Winner et al., 2004) oder unter dem CaMKII-Promoter (40% Reduktion; Marxreiter et al., 2009) exprimieren. Außerdem wurde als gemeinsames Merkmal aller Studien eine beachtliche Anfälligkeit von neuen dopaminergen Neuronen beobachtet, was auf einen Zusammenhang zwischen der α -SYN Pathologie und dem verminderten Überleben dopaminergener Neurone im Bulbus olfactorius der Parkinsonmäuse hinweist (Winner et al., 2004, 2008; Nuber et al., 2008; Marxreiter et al., 2009). In α -SYN KO Mäusen wurde kein Unterschied in der Anzahl an adult-geborenen Neuronen ($1,6 \pm 0,4\%$ BrdU/NeuN; $n=5$ Mäuse) im Vergleich zur Kontrolle (Wildtyp) oder A30P α -SYN Mäusen gemessen ($p > 0,05$; Abbildung 2.6b). Interessanterweise zeigte die Analyse der neugeborenen dopaminergen Zellen nach α -SYN KO ebenfalls eine Reduktion dieser empfindlichen Neuronenpopulation ($22,7 \pm 4,6\%$ TH/BrdU; $n=5$ Mäuse) gegenüber dem Wildtyp ($p < 0,05$; Abbildung 2.6a,c).

2.3.2 Körnerzellen

In der Körnerzellschicht von A30P α -SYN Mäusen wurde nach einem Monat ein Defizit von 44,5% adult-geborenen Neuronen im Vergleich zur Kontrolle (Wildtyp) beobachtet ($2,0 \pm 0,1\%$ BrdU/NeuN; $n=6$ Mäuse vs. $3,6 \pm 0,5\%$ BrdU/NeuN; $n=5$ Mäuse; $p < 0,01$; Abbildung 2.7b,c). Diese Ergebnisse stimmen mit Studien aus anderen Parkinsonmausmodellen überein, die eine Reduktion von 55% (PDGFR- α -SYN; Winner et al., 2004), 41% (CaMKII-A30P α -SYN; Marxreiter et al., 2009) und 40% (mutiertes LRRK2; Winner et al., 2011) zeigen. Zusätzlich wurde die Anzahl an unreifen neuen BrdU-positiven Zellen, welche nach 21 Tagen im Riechkolben vorhanden ist, bestimmt (Abbildung 2.7a). Interessanterweise überlebten zu diesem früheren Zeitpunkt 21,2% weniger unreife Körnerzellen in A30P α -SYN verglichen mit Kontrollmäusen ($3,3 \pm 0,1\%$ BrdU/NeuN; $n=5$ vs. $2,6 \pm 0,1\%$ BrdU/NeuN; $n=5$, $p < 0,01$; Abbildung 2.7d,e). Gleichermäßen war die Anzahl an Doublecortin (DCX)-positiven Zellen, ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein, das ab der Zellteilung bis zur neuronalen Ausreifung und Expression von NeuN exprimiert wird (Brown et al., 2003), in den Parkinsonmäusen um 33,3% reduziert (34.000 ± 4.100 DCX-Zellen/mm³; $n=6$ vs. 51.000 ± 5.200 DCX-Zellen/mm³; $n=6$; $p < 0,05$; Abbildung 2.7d). Die stärkere Reduktion der reifen adult-geborenen Körnerzellen im Vergleich zu den unreifen Zellen deutet auf den Entwicklungsprozess als den kritischen Schritt für das Überleben von adult-geborenen Nervenzellen in Parkinsonmäusen. Die gleiche Analyse in α -SYN KO Mäusen zeigte, dass das Fehlen von α -SYN keinen Einfluss auf das Überleben von adult-geborenen Körnerzellen hat ($2,7 \pm 0,3\%$ BrdU/NeuN; $n=6$; $p > 0,05$; Abbildung 2.7a-d).

2 Ergebnisse

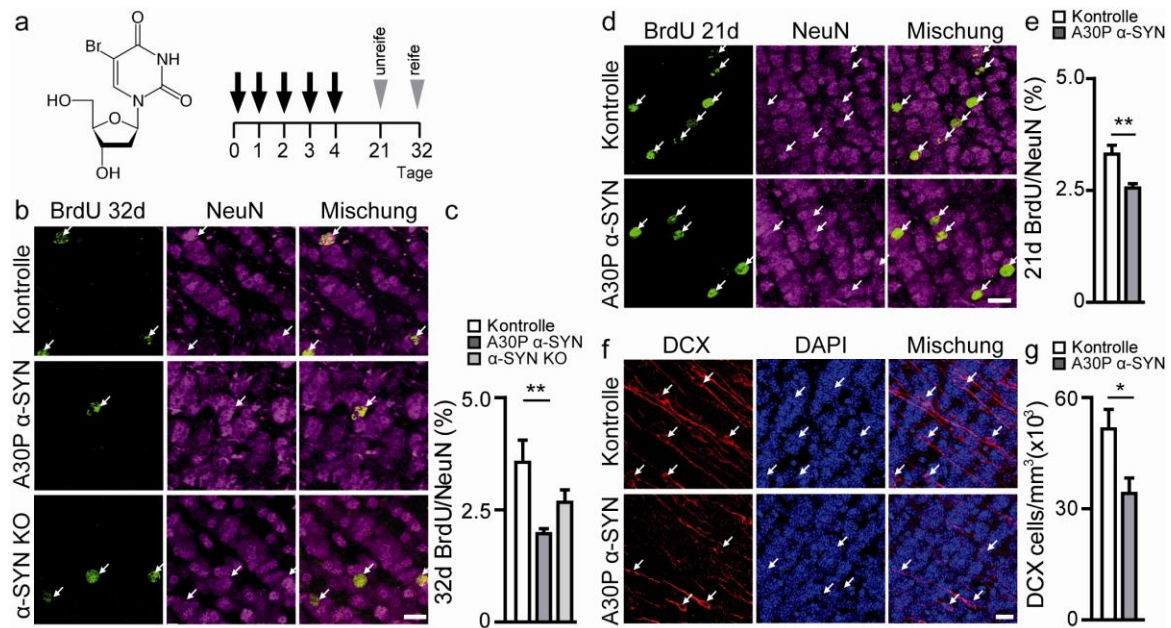


Abbildung 2.7: Verringertes Überleben von adult-geborenen Körnerzellen in A30P α-SYN Mäusen. (a) Strukturformel von 5-Bromo-2'-desoxyuridine (BrdU) und Versuchsschema zur Markierung von unreifen bzw. reifen adult-geborenen Neuronen nach BrdU-Injektionen (schwarze Pfeile) und anschließender Perfusion nach 21 bzw. 32 Tagen (graue Pfeilspitzen). (b) Immunfluoreszente Aufnahmen von 32 Tage alten adult-geborenen (BrdU, grün) Neuronen (NeuN, magenta) in der Körnerzellschicht von 6 Monate alten Kontrolle (Wildtyp), A30P α-SYN und α-SYN KO Mäusen: z-Projektionen von konfokalen Bildstapeln. Maßstab - 10 µm. Doppelt-positive Zellen sind mit einem weißen Pfeil markiert. (c) Quantifizierung des Anteils an reifen BrdU/NeuN positiven Neuronen in der Körnerzellschicht von Kontrolle (n=5), A30P α-SYN (n=6) und α-SYN KO Mäusen (n=6). (d) Immunfluoreszente Aufnahmen von 21 Tage alten adult-geborenen (BrdU, grün) Körnerzellen (NeuN, magenta) in Kontrolle (Wildtyp) und A30P α-SYN Mäusen: z-Projektionen von konfokalen Bildstapeln. Maßstab - 10 µm. (e) Quantifizierung des Anteils an unreifen BrdU/NeuN positiven Körnerzellen in Kontrolle (n=5) und A30P α-SYN Mäusen (n=6). (f) Immunfluoreszente Bilder von unreifen (DCX, rot) adult-geborenen Körnerzellen, die mit DAPI gegengefärbt wurden, in beiden Gruppen: z-Projektionen von konfokalen Bildstapeln. Maßstab - 10 µm. Weiße Pfeile weisen beispielhaft auf einige unreife Zellen. Maßstab - 10 µm. (g) Quantifizierung der Anzahl an DCX-positiven Körnerzellen pro mm³ in Kontrolle und A30P α-SYN Mäusen. *p<0,05; **p<0,01; einfaktorielle Varianzanalyse mit Tukey-Kramer post-hoc Test (c); Studentischer t-Test (e,f).

2.4 Untersuchung der dendritischen Reifung von adult-geborenen Neuronen in A30P α-SYN und α-SYN KO Mäusen

Die Dynamik der dendritischen Entwicklung von neugeborenen Zellen des Riechkolbens wurde von Mizrahi (2007) ausführlich beschrieben. Um den Einfluss von aggregationsanfälligem A30P α-SYN auf die Ausreifung von adult-geborenen Neuronen zu testen, wurde in einem nächsten Schritt ihre dendritische Morphologie genauer untersucht. Zu diesem Zweck wurden die adult-geborenen Neurone mit lentiviralen (LV), fluoreszierenden eGFP und tdTomato Konstrukten markiert. Diese wurden stereotaktisch in den RMS, den Migrationsweg der neuen Zellen, von 5 Monate alten Kontrolle (Wildtyp), A30P α-SYN und α-SYN KO Mäusen injiziert (Material und Methoden, Abbildung 4.5; Livneh et al., 2009). Vier Wochen nach der Injektion (28 dpi) wurden die

Mäuse unter starker Narkose perfundiert, und dicke Schnitte des Riechkolbens mit GFP- und RFP-Antikörpern nachgefärbt. Für die morphologische Analyse wurden die gesamten dendritischen Bäume der markierten Nervenzellen aus konfokal-aufgenommenen Bildstapeln mittels Neurolucida (MicrobrightField) rekonstruiert (Abbildungen 2.8a, 2.9d). Als Schlüsselparameter für die neuronale Reifung wurden die gesamte Dendritenlänge, die distal-apikale Dendritenlänge, die Anzahl an Verzweigungen pro Dendritenbaum und der Somadurchmesser in adult-geborenen Körnerzellen und periglomerulären Zellen gemessen.

2.4.1 Körnerzellen

Die morphologische Analyse von Körnerzellen zeigte, dass die gesamte Dendritenlänge nicht signifikant unterschiedlich war in A30P α -SYN und Wildtyp ($691 \pm 78 \mu\text{m}$; $n=7$ Mäuse vs. $804 \pm 50 \mu\text{m}$; $n=6$ Mäuse; $p>0,05$; Abbildung 2.8b). Interessanterweise war die Länge der distalen apikalen Dendriten in Parkinsonmäusen signifikant vermindert ($381 \pm 59 \mu\text{m}$; $n=7$ Mäuse vs. $538 \pm 29 \mu\text{m}$; $n=6$ Mäuse; $p<0,05$; Abbildung 2.8c). Außerdem zeichneten sich die adult-geborenen Körnerzellen dieses Genotyps durch eine geringere Anzahl an dendritischen Verzweigungen aus ($4,6 \pm 0,5$; $n=7$ Mäuse vs. $6,5 \pm 0,6$; $n=6$ Mäuse; $p<0,05$; Abbildung 2.8d). Die gleichen Messungen in α -SYN KO Mäusen zeigten weder Unterschiede in der gesamten Dendritenlänge ($737 \pm 36 \mu\text{m}$; $n=5$ Mäuse) und distal-apikalen Länge ($441 \pm 29 \mu\text{m}$; $n=5$ Mäuse) noch deren Verzweigungen ($6,9 \pm 1,0$; $n=5$ Mäuse; $p>0,05$; Abbildung 2.8a-d). Der Somadurchmesser war in allen drei Gruppen ähnlich und wies Werte um $40 \mu\text{m}$ auf (Abbildung 2.8e; $p>0,05$).

2.4.2 Periglomeruläre Neurone

Aufgrund ihrer Lage in den oberen Zellschichten des Riechkolbens konnten die Dendritenbäume von neuen periglomerulären Neuronen mittels Zwei-Photonen-Mikroskopie über mehrere Zeitpunkte *in vivo* untersucht werden (Mizrahi, 2007). Dazu wurden LV-markierte Nervenzellen ab 21 dpi an fünf hintereinander folgenden Tagen aufgezeichnet, und 28 dpi erneut mikroskopiert (Abbildung 2.9a). In der Kontrolle (Wildtyp) zeigte die Dendritenlänge von Spine-tragenden periglomerulären Neuronen einen signifikanten Anstieg über die Zeit von $499 \pm 3 \mu\text{m}$ (21 dpi) bis $773 \pm 76 \mu\text{m}$ (28 dpi) ($n=1$ Maus; 2 Neurone; $p<0,05$; einfaktorielle Varianzanalyse mit Tukey-Kramer post-hoc Test; Abbildung 2.9b), während in A30P α -SYN Mäusen kein vergleichbarer Anstieg beobachtet wurde ($291 \pm 86 \mu\text{m}$ bis $330 \pm 75 \mu\text{m}$; $n=1$ Maus; 3 Neurone; $p>0,05$). Hier blieb die Dendritenlänge während des gesamten Zeitraumes auf einem relativ konstanten Niveau, das sich im letzten Zeitpunkt signifikant von der Kontrollkurve unterschied ($p<0,05$; zweifaktorielle Varianzanalyse mit Bonferroni post-hoc Test). Die Analyse von

2 Ergebnisse

dendritischen Verzweigungen über die Zeit zeigte in der Kontrolle ebenfalls einen klaren Trend in Richtung zunehmender Verzweigungspunkte ($6,5 \pm 1,8$ bis $11,0 \pm 1,9$; $n=1$ Maus; 2 Neurone; $p=0,06$), der in A30P α -SYN Mäusen nicht erkennbar war ($4,7 \pm 1,6$ bis $5,0 \pm 1,9$; $n=1$ Maus; 3 Neurone; $p>0,05$; Abbildung 2.9c). Aufgrund der niedrigen Tierzahlen und der relativ hohen Standardabweichung war hier kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen zu verzeichnen ($p>0,05$).

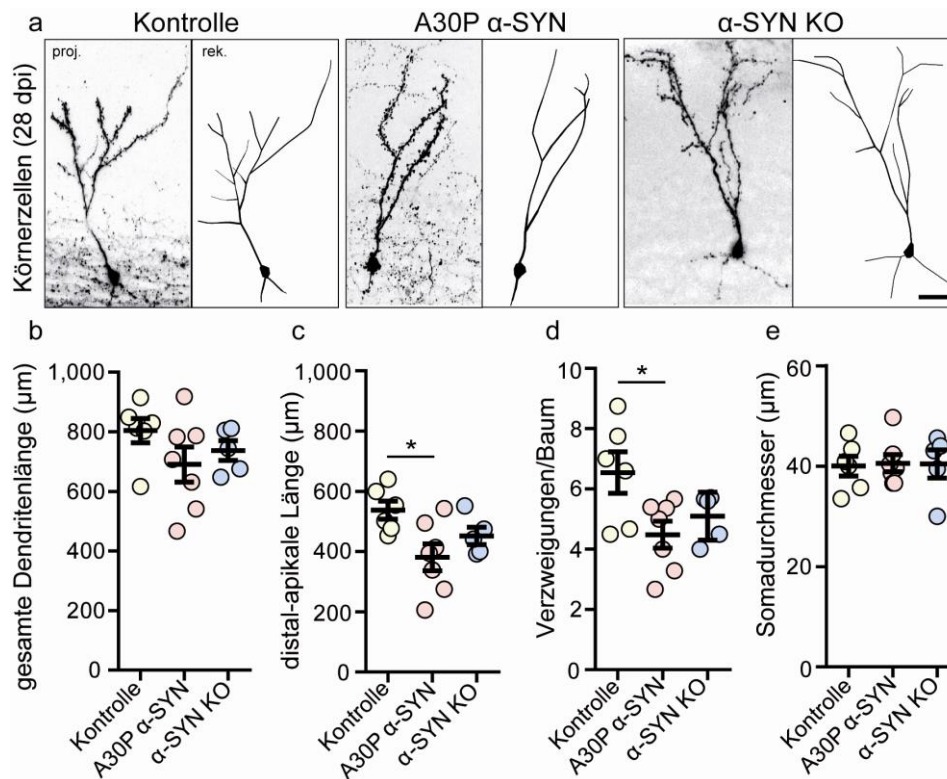


Abbildung 2.8: Unvollständige dendritische Reifung von adult-geborenen Körnerzellen in A30P α -SYN Mäusen. (a) Repräsentative konfokale Bildprojektionen von lentiviral-markierten Körnerzellen (links) an Tag 28 nach Injektion, inklusive der Rekonstruktionen ihrer gesamten Dendritenbäume (rechts) in 6 Monate alten Kontrolle (Wildtyp), A30P α -SYN und α -SYN KO Mäusen. Hinweis: Signifikant reduzierte Verzweigungen der apikalen Dendriten von A30P α -SYN Mäusen. Maßstab - 20 μm . Zusammenfassende Diagramme mit Quantifizierung der (b) gesamten und (d) distalen apikalen Dendritenlänge, (d) Anzahl an Verzweigungen pro Baum und (e) Somadurchmesser in Kontrolle (Wildtyp), A30P α -SYN und α -SYN KO Mäusen ($n=6, 7$ und 5 Mäuse pro Gruppe). $*p<0,05$; einfaktorielle Varianzanalyse mit Tukey-Kramer post-hoc Test.

Eine Quantifizierung der dendritischen Reifung adult-geborener periglomerulären Neurone an Tag 28 (Abbildung 2.9d-f) zeigte eine signifikant reduzierte Dendritenlänge in A30P α -SYN Mäusen ($444 \pm 38 \mu\text{m}$; $n=13$ Mäuse vs. $687 \pm 101 \mu\text{m}$; $n=7$ Mäuse; $p<0,05$; Abbildung 2.9d). Zudem wurden in den transgenen Tieren signifikant weniger Verzweigungen gezählt ($3,9 \pm 1,0$; $n=13$ Mäuse vs. $7,7 \pm 2,1$; $n=7$ Mäuse; $p<0,05$; Abbildung 2.9e). Interessanterweise wurden in α -SYN KO Mäusen eine reduzierte Dendritenlänge ($391 \pm 32 \mu\text{m}$; $n=7$ Mäuse; $p<0,05$) bei gleicher Anzahl an Verzweigungen ($6,9 \pm 1,0$; $n=7$ Mäuse; $p>0,05$; Abbildung 2.9d-f) bestimmt. Insgesamt deuten die

verminderte Länge und Verzweigung der dendritischen Bäume in adult-geborenen Neuronen der A30P α -SYN Mäuse zu einem späten Reifungszeitpunkt (28 dpi; Abbildungen 2.8c,d und 2.9d,e), zusammen mit dem verminderten Auswachsen des Nervenzellbaumes während der Reifungsphase (21-28 dpi; Abbildung 2.9b), auf eine Störung in der dendritischen Entwicklung von neuen Körnerzellen und periglomerulären Neuronen im Bulbus olfactorius.

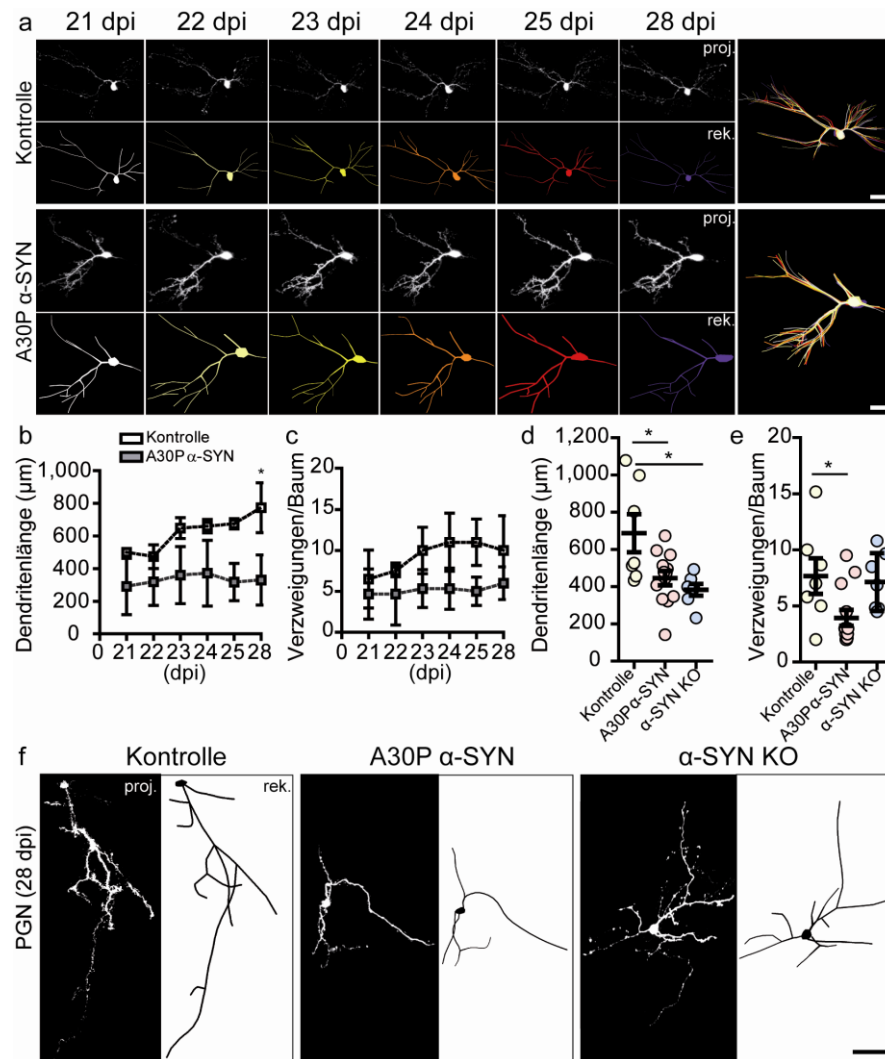


Abbildung 2.9: Unvollständige dendritische Entwicklung adult-geborener periglomerulärer Neuronen in A30P α -SYN Mäusen *in vivo*. (a) Bildserien der chronisch mikroskopierten periglomerulären Neurone 21-28 dpi in lebenden Kontrolle (Wildtyp) und A30P α -SYN Mäusen: z-Projektionen von zwei-photonen-mikroskopischen Bildstapeln, inklusive 2D-Rekonstruktionen. Maßstab - 20 μ m. Quantifizierung der Veränderung von (b) gesamter Dendritenlänge und (c) Anzahl an Verzweigungen über die Zeit in 6 Monate alten Kontrolle (Wildtyp; n=1 Maus; 2 Neurone) und A30P α -SYN Mäusen (n=1 Maus; 3 Neurone). (d) 28 dpi: gesamte Dendritenlänge und (e) Anzahl an Verzweigungen pro Baum in den periglomerulären Zellen von Kontrolle, A30P α -SYN und α -SYN KO (n=7, 13 und 7 Mäuse). (f) Repräsentative Aufnahme der periglomerulären Neurone (28 dpi) in den drei Gruppen: z-Projektionen von zwei-photonen-mikroskopischen bzw. konfokalen Bildstapeln, inklusive 2D-Rekonstruktionen. Maßstab - 20 μ m. *p<0,05; zweifaktorielle Varianzanalyse mit Bonferroni post-hoc Test (b,c); einfaktorische Varianzanalyse mit Tukey-Kramer post-hoc Test (d,e).

2.5 *In vivo* Analyse der neuronalen Plastizität von dopaminergen adult-geborenen Nervenzellen in A30P α -SYN Mäusen

In den Abbildungen 2.4b und 2.5c wurde gezeigt, dass dopaminerge periglomeruläre Neurone sensibel auf die A30P α -SYN Pathologie im Riechkolben reagieren und vermehrt absterben. Da diese Nervenzellen (i) bekannterweise bei Morbus Parkinson betroffen sind, (ii) selektiv markiert werden können, und (iii) eine oberflächliche Lage aufweisen, die sie für die Zwei-Photonen-Mikroskopie zugänglich macht, wurde im Folgenden die Integration von dopaminergen Neuronen genauer untersucht. Dazu wurden die Neurone mit einem Fluorophor genetisch markiert und ihr täglicher Umsatz in einem ‚kranken‘ (A30P α -SYN) und ‚gesunden‘ (Wildtyp) Netzwerk mittels chronischer Intravitalmikroskopie verglichen. Diese Beobachtungen zu der kontinuierlichen Eingliederung von neuen Zellen und ihrem weiteren Schicksal erlaubt Rückschlüsse auf den Einfluss von aggregations-anfälligem A30P α -SYN auf die neuronale Plastizität im Riechkolben von Parkinsonmäusen.

2.5.1 Genetische Markierung von dopaminergen Neuronen in A30P α -SYN Mäusen

Da dopaminerge Neurone morphologisch nicht von anderen periglomerulären Zelltypen unterscheidbar sind, mussten diese für die Intravitalmikroskopie anhand ihres chemischen Markers spezifisch markiert werden. Dazu wurde ein Cre/lox-System mit einem TH-Promoter verwendet, der die zell-spezifische Expression eines Fluoreszenzgens in dopaminergen Neuronen steuert (Material und Methoden, Abbildung 4.2). Diese genetische Rekombination wurde durch die Verkreuzung einer Knockin-Driver Linie, die Cre-Rekombinase vom TH-Lokus exprimiert (TH-IRES-Cre; Lindeberg et al., 2004), mit einer tdTomato-Reporter Linie, die vor dem Fluoreszenzgen ein *loxP*-flankierendes STOP-Codon trägt (Madisen et al., 2010), erzielt. In den Nachkommen der F1-Generation wird das STOP-Codon enzymatisch herausgeschnitten, was die Fluorophorexpression in Cre-exprimierenden Geweben aktiviert. Diese doppelt-transgenen Mäuse dienten als Wildtypkontrolle, auf die sich im Folgenden als TH-Kontrolle bezogen wird. Für die Markierung von dopaminergen Neuronen in einem Parkinsonmodell wurden die Driver- und Reporterlinien zusätzlich mit der A30P α -SYN Linie verpaart (Kahle et al., 2000), bezeichnet als TH-A30P α -SYN. Frühere Studien berichteten von einem unspezifischen Leck dieses Cre/lox Modells (Lindeberg et al., 2004; Adam und Mizrahi, 2011). Um die Präzision der genetischen Markierung in der glomerulären Schicht von TH-Mäusen (9 Monate alt) zu überprüfen, wurden Schnitte des Riechkolbens mit Antikörpern gegen TH und zwei andere periglomeruläre Zellmarker, CB und CR, gefärbt (Abbildung 2.10a,b). In Übereinstimmung mit Adam und Mizrahi (2011) wurde die Expression des Fluorophors tdTomato auch in der Körnerzell- und

Mitralzellschicht (hier jedoch nur in den Körnerzellen) detektiert, Regionen die normalerweise keine TH exprimieren (Abbildung 2.10a). In der glomerulären Schicht, wo dopaminerge Neurone lokalisiert sind, zeigte die Quantifizierung aller doppelt-markierten Zellkörper (tdTomato mit oder ohne Marker), dass eine Mehrheit von $71,0 \pm 4,8\%$ der tdTomato positiven Zellen auch gleichzeitig TH-positiv sind ($n=3$ Mäuse; 1.698 Zellen; Abbildung 2.10c). Nur ein sehr geringer Anteil der tdTomato-positiven Zellen exprimierte auch CR ($5,0 \pm 7,5\%$; $n=4$ Mäuse; 2.752 Zellen), und beinahe keine Zelle zeigte CB-Positivität ($0,3 \pm 0,2\%$; $n=4$ Mäuse; 2.313 Zellen; Abbildung 2.10c).

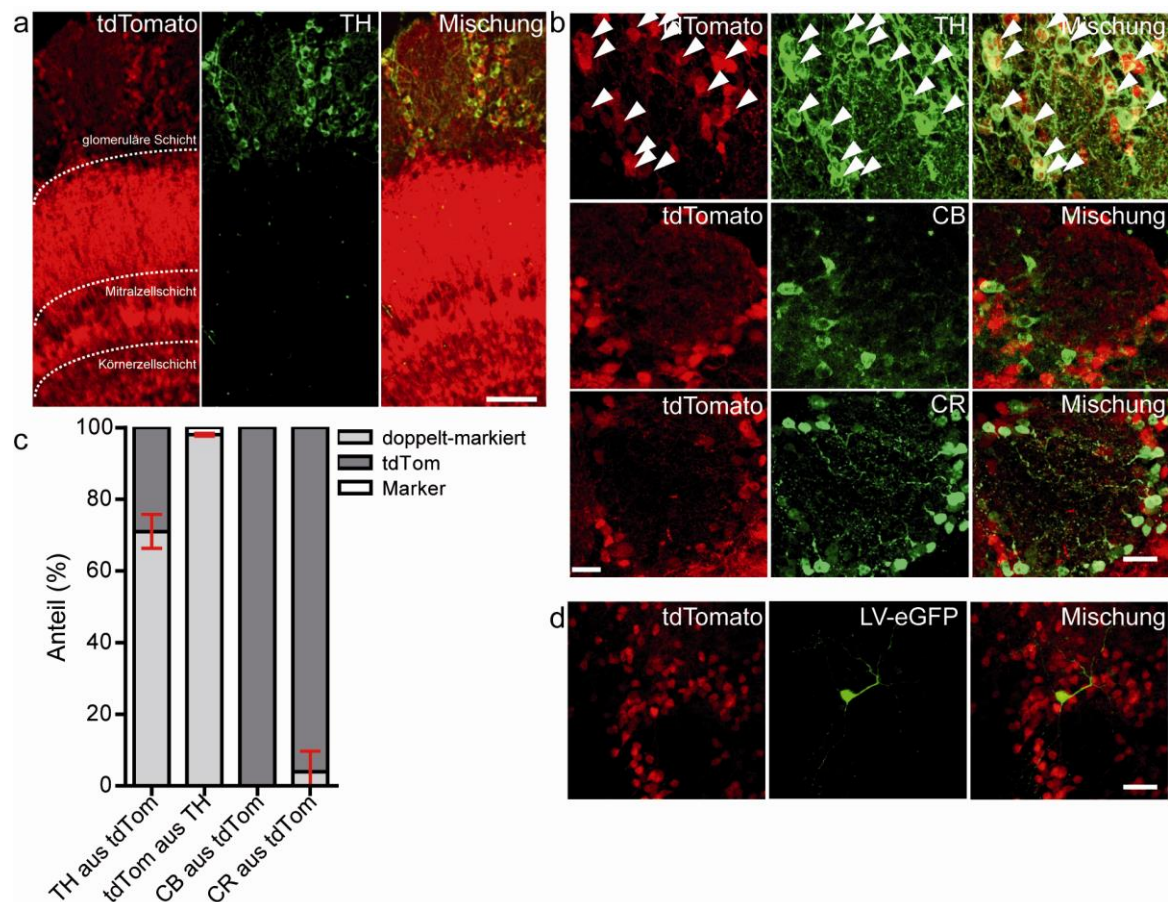


Abbildung 2.10: Genetische Markierung von dopaminergen Nervenzellen im Riechkolben von TH-A30P α -SYN und TH-Kontrolle Mäusen. (a) Immunfluoreszenz Aufnahme der tdTomato (rot) und Tyrosinhydroxylase (TH, grün) Expression in den unterschiedlichen Zellschichten des Riechkolbens in TH-A30P α -SYN Mäusen: z-Projektionen von konfokalen Bildstapeln. Maßstab - 50 μ m. (b) Aufnahmen eines vergrößerten Glomerulus mit tdTomato-positiven Neuronen, Immunfluoreszenzfärbung für TH, CB bzw. CR (grün) und den dazugehörigen Überlagerungen: z-Projektionen von konfokalen Bildstapeln. Maßstab - 20 μ m. Weiße Pfeile deuten beispielhaft auf doppelt-markierte Zellen. (c) Quantifizierung von einzelt- und doppelt-markierten neuronalen Zellkörpern in der glomerulären Schicht von TH-A30P α -SYN Mäusen, die tdTomato mit oder ohne TH, CR und CB exprimieren. TH aus tdTomato, $71,0 \pm 4,8\%$ der tdTomato positiven Zellen exprimieren TH; tdTomato aus TH, $98,0 \pm 0,4\%$ der TH positiven Zellen exprimieren tdTomato ($n=3$ Mäuse; 1.698 Zellen); CB aus tdTomato, $0,3 \pm 0,2\%$ der tdTomato positiven Zellen exprimieren CB ($n=4$ Mäuse; 2.313 Zellen); CR aus tdTomato, $5,0 \pm 7,5\%$ der tdTomato positiven Zellen exprimieren CR ($n=4$ Mäuse; 2.752 Zellen). Werte sind als Mittel \pm SD angegeben. (d) Hochauflösende Aufnahme einer 2 Monate alten, lentiviral-markierten dopaminergen adult-geborenen Nervenzelle (grün) in einer TH-A30P α -SYN Maus (rot): z-Projektionen von zwei-photonen-mikroskopischen Bildstapeln. Maßstab - 20 μ m.

Um die Stabilität dieses Markierungssystems innerhalb der Zeitspanne des *in vivo* Mikroskopierens zu bestätigen, wurde zusätzlich die Anzahl der tdTomato/TH-doppelt-positiven Zellen in 12 Monate alten Mäusen untersucht. Die älteren Mäuse zeigten eine ähnliche Verteilung der tdTomato-positiven Zellen, die gleichzeitig TH exprimierten ($69,9 \pm 2,6\%$; $n=2$ Mäuse; 226 Zellen; $p>0,05$; Studentscher *t*-Test). Insgesamt sind diese Befunde vergleichbar mit der Studie von Adam und Mizrahi (2011), die heterozygote Z/EG-GFP-Cre-Reporter Mäuse für die Fluoreszenzfärbung der dopaminergen Neurone verwendeten. Durch Injektion eines lentiviralen eGFP-Konstruktes in den RMS wurde zusätzlich bestätigt, dass in den transgenen TH-Mäusen auch adult-geborene dopaminerge Neurone markiert werden. Zwei Monate nach der Injektion wurde ein sehr kleiner Anteil an adult-geborenen Nervenzellen in der glomerulären Schicht identifiziert, welcher sowohl für eGFP als auch für tdTomato positiv war (Abbildung 2.10d).

Insgesamt stellt dieses Cre/lox System eine geeignete Methode zur genetischen Markierung von dopaminergen Neuronen im Riechkolben der Parkinsonmäuse dar. Sobald die adult-geborenen Nervenzellen TH exprimieren, kann ihr Umsatz im olfaktorischen Netzwerk über längere Zeit mittels *in vivo* Zwei-Photonen-Mikroskopie verfolgt werden.

2.5.2 Kinetische Analyse des Umsatzes und des Schicksals von dopaminergen adult-geborenen Neuronen in A30P α -SYN Mäusen

Um die dynamische Integration der adult-geborenen Nervenzellen *in vivo* zu untersuchen, wurde nach der *open-skull* Methode ein kraniales Fenster über beiden Riechkolben implantiert (Material und Methoden, Abbildung 4.3). In Übereinstimmung mit früheren Studien im Kortex (Holtmaat et al., 2009) und Bulbus olfactorius (Adam und Mizrahi, 2011) wurde in dieser Arbeit mit der verwendeten Operationstechnik eine Erfolgsquote von 50-60% mikroskopierbarer Fenster erzielt. Die optische Klarheit für hochqualitatives Mikroskopieren blieb in der Regel während der gesamten Versuchsperiode erhalten (Material und Methoden, Abbildung 4.3). Da *open-skull* Operationen bis zu 3 Wochen nach dem chirurgischen Eingriff mit der Aktivierung von Glia assoziiert sind (Lee et al., 2009; Adam und Mizrahi, 2011), wurde mit der Zwei-Photonen-Mikroskopie erstmals nach 4 Wochen begonnen (Abbildung 2.11a), um den möglichen Einfluss einer Gliose auf die Untersuchung auszuschließen (Material und Methoden, Abbildung 4.4).

Neun Monate alte TH-A30P α -SYN und TH-Kontrolle (Wildtyp) Mäusen wurden in einem 2-wöchigen Intervall für einen Gesamtzeitraum von 2,5 Monaten mikroskopiert (Abbildung 2.11a). Da der Nervenzellumsatz einen kontinuierlichen Prozess darstellt, wurde dieses Zeitfenster gewählt, um die Ursache für den Verlust an dopaminergen

Neuronen in 6 und 12 Monate alten Parkinsonmäusen aufzuklären (Abbildung 2.4b). Da die finale Differenzierung in den molekularen Phänotyp von adult-geborenen Zellen (hier: TH-Expression) die Ausbildung synaptischer Kontakte voraussetzt (Winner et al., 2002; Carleton et al., 2003), zeigte das Erscheinen von tdTomato-positiven Zellkörpern innerhalb des zu mikroskopierenden Volumens die Integration von neugeborenen dopaminergen Neuronen an. Im Gegensatz dazu indiziert das Verschwinden von roten Somata den Zelltod dieser Neurone im Interneuronennetzwerk. Deshalb konnte über die Zeit die genaue Anzahl an stabilen, verloren gegangenen und neu gewonnen, TH-positiven Nervenzellen aufgenommen und ausgewertet werden (Abbildung 2.11b-d).

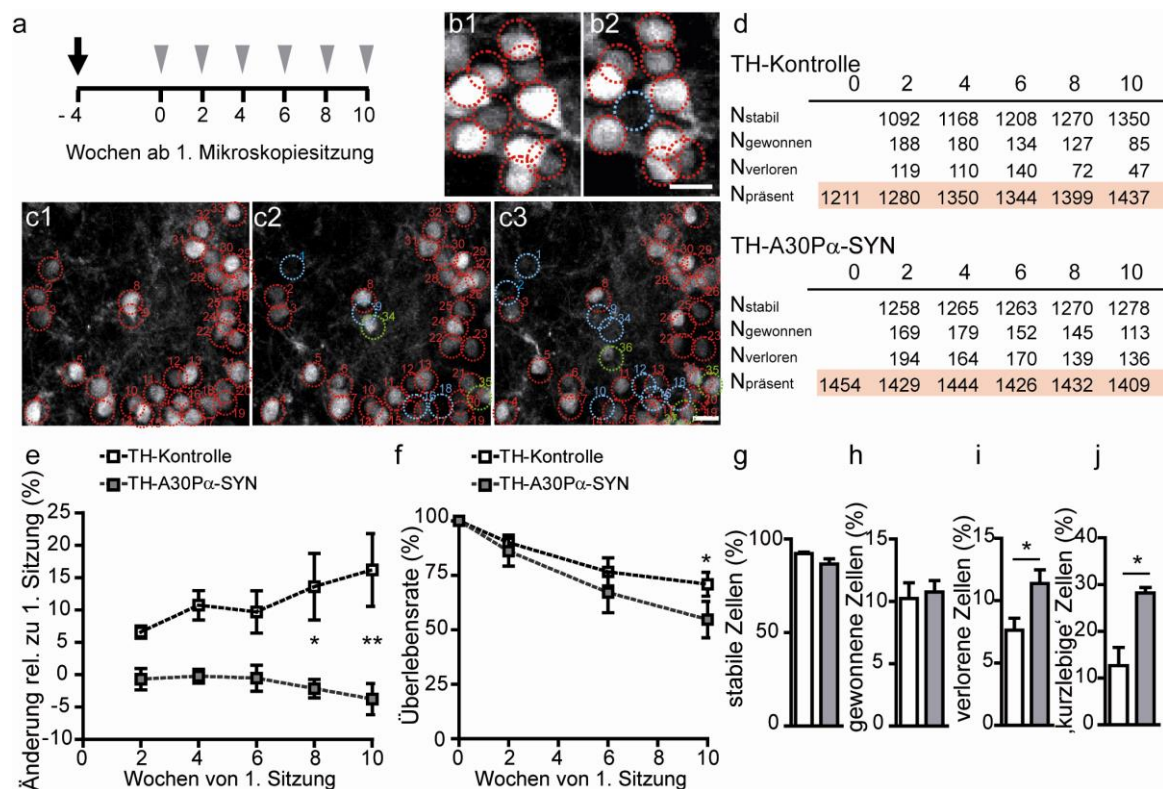


Abbildung 2.11: Instabile Integration von dopaminergen Neuronen in TH-A30P α -SYN Mäusen *in vivo*. (a) Experimentelles Zeitschema der Fensterimplantation (schwarzer Pfeil) gefolgt von der *in vivo* Zwei-Photonen-Mikroskopie (graue Pfeilspitzen) in einem 2-wöchigen Intervall für insgesamt 2,5 Monate. Die Mäuse waren 8 Monate alt zu Beginn des Versuches. (b1,b2) Hochauflöste Aufnahmen von tdTomato-markierten, dopaminergen Nervenzellen in zwei hintereinander folgenden Mikroskopiesitzungen: z-Projektionen von zwei-photonen-mikroskopischen Bildstapeln. Eine verlorene Zelle (blau) inmitten einer Mehrheit an stabilen Zellkörpern (rot). Maßstab - 10 μ m. (c) Verfolgung von stabilen (rot), gewonnenen (grün) und verlorenen (blau) periglomerulären Neuronen in der (c1) ersten, (c2) zweiten und (c3) dritten Mikroskopiesitzung: z-Projektionen von zwei-photonen-mikroskopischen Bildstapeln. Maßstab - 10 μ m. (d) Tabelle mit den absoluten Zellzahlen der stabilen (N_{stabil}), verlorenen (N_{verloren}), gewonnenen (N_{gewonnen}) und präsenten (N_{präsent}) Zellen zu den verschiedenen Zeitpunkten in TH-Kontrolle (Wildtyp) und TH-A30P α -SYN Mäusen. (e) Quantifizierung der prozentualen Veränderung in der dopaminergen Neuronenpopulation relativ zur ersten Mikroskopiesitzung in TH-A30P α -SYN (n=4) und TH-Kontrolle (Wildtyp) Mäusen (n=5). (f) Überlebensraten der dopaminergen Neuronen relativ zur ersten Mikroskopiesitzung in beiden Gruppen (n=4 und 5 Mäuse). Quantifizierung der mittleren Anteile an (g) stabilen, (h) gewonnenen, (i) verlorenen und (j) ‚kurzlebigen‘ Nervenzellen pro Mikroskopieintervall. *p<0,05, **p<0,01; Studentischer t-Test (g-j); zweifaktorielle Varianzanalyse mit Bonferroni post-hoc Test (e,f).

2 Ergebnisse

Die mittlere Umsatzrate, die die Gesamtmenge an gewonnenen und verlorenen Neuronen pro Tag wiedergibt, war ähnlich in TH-A30P α -SYN und TH-Kontrolle (Wildtyp) Mäusen ($0,8 \pm 0,1$ Neurone pro Tag; $n=4$ Mäuse; 1.454 Zellen vs. $0,6 \pm 0,2$ Neurone pro Tag; $n=5$ Mäuse; 1.437 Zellen; $p>0,05$; nicht abgebildet). Interessanterweise wurden Veränderungen in der Dichte der Nervenzellpopulation relativ zur ersten Mikroskopiesitzung gemessen (Abbildung 2.11e). Während in TH-Kontrolle Mäusen durch kontinuierliches Hinzufügen von neuen Neuronen ein stetiger Anstieg der dopaminergen Zellen bis zu $16,1 \pm 5,5\%$ nach 2.5 Monaten verzeichnet wurde (Abbildung 2.11e; $p<0,01$; einfaktorielle Varianzanalyse mit Tukey-Kramer post-hoc Test), blieb diese Zunahme in TH-A30P α -SYN Mäusen aus. Vielmehr sank in den Parkinsonmäusen die Nettoanzahl an dopaminergen Neuronen geringfügig auf $-3,8 \pm 2,4\%$ über die Zeit ab, blieb statistisch gesehen jedoch auf dem gleichen Niveau ($p>0,05$). Ein Vergleich des Kurvenverlaufs beider Genotypen zeigte signifikante Unterschiede in den letzten beiden Mikroskopiesitzungen ($p<0,05$; $p<0,01$; Abbildung 2.11e). Als ursächlich für dieses Defizit in A30P α -SYN Mäusen wurde eine signifikant erniedrigte Überlebensrate der TH-positiven Zellen über die Zeit beobachtet (Abbildung 2.11f). In der Tat waren $70,9 \pm 5,5\%$ der zum ersten Zeitpunkt gezählten Neurone in TH-Kontrolle Mäusen auch noch nach 2,5 Monaten vorhanden, während dieser Wert in Parkinsonmäusen auf $54,7 \pm 8,3\%$ reduziert war ($p<0,05$). Eine detaillierte Analyse der mittleren prozentualen Anteile an stabilen, verlorenen und gewonnenen Zellen pro Mikroskopieintervall (Abbildung 2.11g-j) zeigte interessanterweise einen beinahe identischen Anteil an neu hinzukommenden Neuronen in Parkinson- und Kontrollmäusen ($10,2 \pm 1,4\%$ vs. $10,7 \pm 0,9\%$; Abbildung 2.11h). Parallel dazu wurde ein signifikant höherer Anteil an verlorenen Nervenzellen in TH-A30P α -SYN Mäusen verzeichnet ($11,4 \pm 1,1\%$ vs. $7,6 \pm 1,0$; $p<0,05$; Abbildung 2.11i). Für eine genauere Charakterisierung des Zeitpunktes des Nervenzellverlustes wurde zusätzlich der Anteil an 'kurzlebigen' Neuronen bestimmt, Zellen die in einer Mikroskopiesitzung neu erschienen, in der darauffolgenden jedoch nicht mehr nachweisbar waren (Abbildung 2.11j). Diese 'kurzlebigen' Zellen stellen einen geeigneten Messparameter für die Integrationsstabilität der Neurone dar. Außerdem liefern sie wichtige Hinweise auf die zeitliche Einordnung des toxischen A30P α -SYN Effektes. TH-A30P α -SYN zeigten im Vergleich zu TH-Kontrolle Mäusen mehr als doppelt so viele 'kurzlebige' Zellen pro Mikroskopieintervall ($33,5 \pm 2,6\%$ vs. $11,6 \pm 6,5\%$; $p<0,05$). Dieses verminderte Überleben der dopaminergen Neurone in den Parkinsonmäusen spiegelte sich zudem in einem starken Trend zu einem geringeren Anteil an stabilen Zellen pro Zeitpunkt wider ($86,6 \pm 2,7\%$ vs. $92,2 \pm 0,8\%$ in Kontrollen; $p=0,06$), wie in Abbildung 2.11g veranschaulicht ist.

Insgesamt zeigte diese detaillierte Umsatzanalyse gravierende Auswirkungen von A30P α -SYN auf die stabile Integration von neuen periglomerulären Zellen, welche die glomeruläre Schicht erreichen und sich vermutlich auch in das ‚erkrankte‘ Netzwerk eingliedern, jedoch kurz darauf wieder absterben.

2.6 *In vivo* Analyse der strukturellen Plastizität von adult-geborenen Körnerzellen in A30P α -SYN Mäusen

In diesem Teil der Arbeit wurde der Effekt von A30P α -SYN auf die synaptischen Verbindungen von adult-geborenen Neurone untersucht, um die gestörte dendritische Ausreifung, die fehlerhafte Integration und das verringerte Überleben der neuen Neurone in den transgenen α -SYN Mäusen besser zu beschreiben. Dazu wurden die dendritischen Spines von neuen Körnerzellen durch lentivirale Transduktion mit fluoreszierenden Proteinen markiert (Material und Methoden, Abbildung 4.5), und Spinedichte und -umsatz in unterschiedlichen Reifungsstadien analysiert. Diese Versuche fokussierten auf die synaptische und funktionelle Entwicklung von dendrodendritischen Synapsen (Shepherd et al., 2007; Lepousez et al., 2013) unter der Anwesenheit von pathologischem A30P α -SYN.

2.6.1 Spinedichte

Für die Spineanalyse wurden die distalen apikalen Dendriten in der externen plexiformen Schicht repräsentativ für alle adult-geborenen Körnerzellsynapsen ausgewertet (Whitman und Greer, 2007; Livneh und Mizrahi, 2011), da gezeigt wurde, dass der äußere, plastischere Teil des Dendritenbaumes (Mizrahi, 2007) sensibel auf die A30P α -SYN Überexpression reagiert (Abbildung 2.8). Da die Spinedichte dieser Neurone ein direktes anatomisches Korrelat für die dendrodendritischen Synapsen mit Mitral-/Tufted-Zellen darstellt, deutet jeder Unterschied in der Spinedichte von Parkinsonmäusen und Kontrollen (Wildtyp) auf Veränderungen in der Entwicklung und strukturellen Plastizität mit einem möglichen Einfluss auf die Riechfunktion der Mäuse.

Mittels hochauflösender konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie wurde eine hohe Anzahl von LV-markierten Körnerzelldendriten in Schnitten des Riechkolbens von Kontrolle (Wildtyp), A30P α -SYN und α -SYN KO Mäusen untersucht (Abbildung 2.12a). In Übereinstimmung mit Berichten aus anderen Gehirnregionen (Leuba, 1983; Livneh und Mizrahi, 2011) war die Spinedichte von 4 Wochen alten Körnerzellen (28 dpi) in jungen Kontrollmäusen (3 Monate) höher ($0,81 \pm 0,02$ Spines/ μm ; $n=5$ Mäuse; 36 Dendriten) als in älteren Tieren (6 Monate; $0,66 \pm 0,09$ Spine/ μm ; $n=6$ Mäuse; 118 Dendriten; $p<0,05$; Abbildung 2.12b). Eine Analyse der Spinedichte in jungen

2 Ergebnisse

Parkinsonmäusen zeigte eine um 7,5% reduzierte Spinedichte ($0,75 \pm 0,04$ Spines/ μm ; $n=5$ Mäuse; 62 Dendriten) im Vergleich zur Kontrolle ($p < 0,05$; Abbildung 2.12b). Dieser Unterschied vergrößerte sich im Alter von 6 Monaten und die Parkinsonmäuse zeigten nun eine um 22,7% verminderte Spinedichte ($0,51 \pm 0,04$ Spines/ μm ; $n=6$ Mäuse; 175 Dendriten vs. $0,66 \pm 0,09$ Spines/ μm ; $p < 0,05$; Abbildung 2.12b). Hier ist es erwähnenswert, dass die Spinedichte in 6 Monate alten α -SYN KO Mäusen ($0,62 \pm 0,11$ Spines/ μm ; $n=6$ Mäuse; 61 Dendriten) nicht von der in Kontrollmäusen oder A30P α -SYN Mäusen abwich ($p > 0,05$; Abbildung 2.12b). Insgesamt wurde ein toxischer Effekt von A30P α -SYN auf die neugeborenen Körnerzellen nachgewiesen, während der Verlust des α -SYN Proteins offensichtlich keinen Einfluss auf die Spinedichte hat.

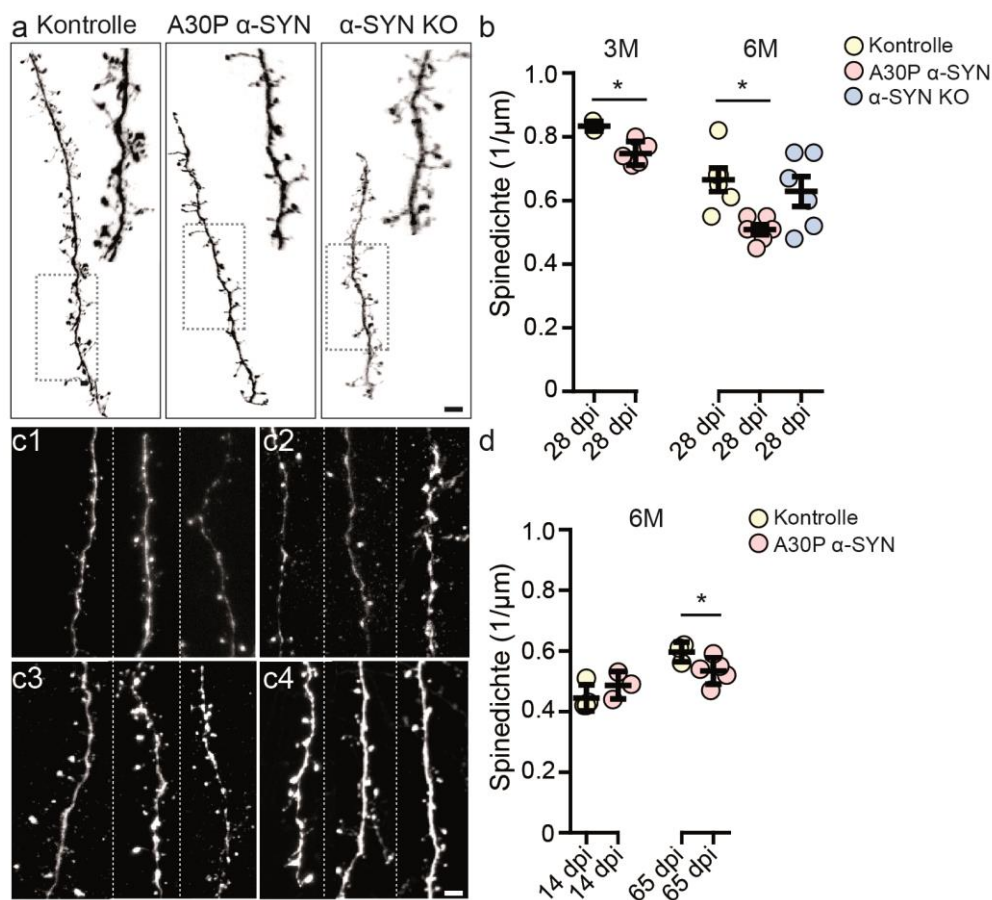


Abbildung 2.12: Reduzierte dendritische Spinedichte in adult-geborenen Körnerzellen von A30P α -SYN Mäusen.

(a) Repräsentative hochauflösende Bilder apikaler Dendritenabschnitte von lentiviral-markierten (LV-eGFP) adult-geborenen Körnerzellen 28 dpi: konfokale z-Projektionen. Sechs Monate alte Kontrolle (Wildtyp), A30P α -SYN und α -SYN KO Mäuse gleichen Alters. Maßstab - 5 μm . (b) Quantifizierung der dendritischen Spinedichte von adult-geborenen Körnerzellen (28 dpi) in 3 Monate alten Kontrolle und A30P α -SYN Mäusen ($n=3$ und 5 Mäuse pro Gruppe; linkes Panel) und 6 Monate alten Kontrolle, A30P α -SYN und α -SYN KO Mäusen ($n=6$ Mäuse pro Gruppe; rechtes Panel). (c) Repräsentative Aufnahmen der apikalen Dendritenabschnitte von lentiviral-markierten, adult-geborenen Körnerzellen 14 dpi in Kontrollen (c1), A30P α -SYN Mäusen (c2) und 65 dpi in Kontrollen (c3) und A30P α -SYN Mäusen (c4): konfokale z-Projektionen. Die Mäuse waren 6 Monate alt. Maßstab - 5 μm . (d) Quantifizierung der adult-geborenen Körnerzellen 14 dpi und 65 dpi in 6 Monate alten Kontrollen und A30P α -SYN Mäusen ($n=3$ und 4 Mäuse pro Gruppe). * $p < 0,05$; einfaktorielle Varianzanalyse mit Tukey-Kramer post-hoc Test (b); Studentischer t -Test (b,d).

Um zu prüfen, ob die reduzierte Spinedichte in A30P α -SYN Mäusen eine persistente Eigenschaft ist, wurden die distal-apikalen Spines von Körnerzellen in zwei weiteren Reifungsstadien der neuronalen Entwicklung (2 und 8 Wochen) untersucht (Abbildung 2.12c,d). Für die zeitliche Kodierung des Nervenzellalters wurden LV-Konstrukte mit unterschiedlich farbigen Fluorophoren zeitverzögert in den RMS injiziert (Material und Methoden, Abbildung 4.5). Interessanterweise war in jungen, unvollständig entwickelten Nervenzellen (2 Wochen), welche die niedrigste Spinedichte aufwiesen, kein Unterschied zwischen Parkinsonmäusen ($0,48 \pm 0,04$ Spines/ μm ; $n=3$ Mäuse; 16 Dendriten) und Kontrolle (Wildtyp; $0,44 \pm 0,04$ Spines/ μm ; $n=4$ Mäuse; 26 Dendriten; $p>0,05$; Abbildung 2.12c1-c2,d) erkennbar, während nach 8 Wochen die Spinedichte der Kontrolle die der transgenen α -SYN Mäuse signifikant überschritt ($0,60 \pm 0,04$ Spines/ μm ; $n=3$ Mäuse; 34 Dendriten vs. $0,53 \pm 0,04$ Spines/ μm ; $n=5$ Mäuse; 60 Dendriten; $p<0,05$; Abbildung 2.12c3-c4,d). Insgesamt zeigten diese Ergebnisse eine beträchtliche Reduktion der dendritischen Spinedichte während der Entwicklung und Integration der neuen Nervenzellen in A30P α -SYN Mäusen. Diese synaptischen Veränderungen waren auch noch in einem höheren Nervenzellalter zu beobachten.

2.6.2 Spineumsatz und Spinestabilität

Für ein besseres Verständnis des beschriebenen Defizits an dendritischen Synapsen in adult-geborenen Körnerzellen von A30P α -SYN Mäusen wurden im Folgenden einzelne dendritische Spines während der neuronalen Entwicklung in ihrer natürlichen Umgebung über mehrere Zeitpunkte verfolgt. Dabei ermöglichte die Kombination aus der zeitlich kodierten Markierung von neuen Zellen durch LV-Transduktion und der intravitalem Zwei-Photonen-Mikroskopie durch ein kraniales Fensters über den Riechkolben die wiederholte Untersuchung der Neurone mit einem definierten Alter (Material und Methoden, Abbildungen 4.3, 4.5, 4.6 und 4.7). Obwohl die Körnerzellsomata tief im Riechkolben liegen, verzweigen sich ihre apikalen Dendriten bis in die oberflächlicher gelegenen Regionen der externen plexiformen Schicht, die eine für die *in vivo* Zwei-Photonen-Mikroskopie zugängliche Tiefe aufweist.

In zwei unanhängigen Kohorten von 6 Monate alten Mäusen wurde Spinedichte und Spineumsatz von LV-eGFP-markierten Körnerzelldendriten über mehrere Tage durch Quantifizierung von stabilen, gewonnenen und verlorenen Spines in frühen (21-25 dpi) und späten (28-44 dpi) Reifungsstadien bestimmt (Abbildung 2.13a-c). In der Kontrolle (Wildtyp) wurde eine schrittweise Zunahme der Spinedichte gemessen ($0,54 \pm 0,05$ Spines/ μm vs. $0,65 \pm 0,07$ Spines/ μm , 21 und 25 dpi, $n=5$ Mäuse; $p<0,01$; einfaktorielle Varianzanalyse mit Tukey-Kramer post-hoc Test), die in den Körnerzellen von A30P α -SYN Mäusen im gleichen Zeitintervall nicht beobachtet werden konnte.

2 Ergebnisse

($0,47 \pm 0,07$ Spines/ μm vs. $0,45 \pm 0,08$ Spines/ μm , $n=3$ Mäuse; $p>0,05$; Abbildung 2.13c). Dieser Unterschied spiegelte sich auch beim Vergleich der Mittelwerte für die Spinedichte wider, die ab 23 dpi für drei hintereinander folgende Zeitpunkte in beiden Gruppen signifikant voneinander abwichen ($p<0,01$; Abbildung 2.13d). Einen ähnlichen Trend zeigte die Analyse der relativen Änderung der Spinedichte im Vergleich zum ersten Zeitpunkt, da sowohl der Anstieg als auch die Differenzen zwischen beiden Genotypen über die Zeit größer wurde ($p<0,01$; Abbildung 2.13e).

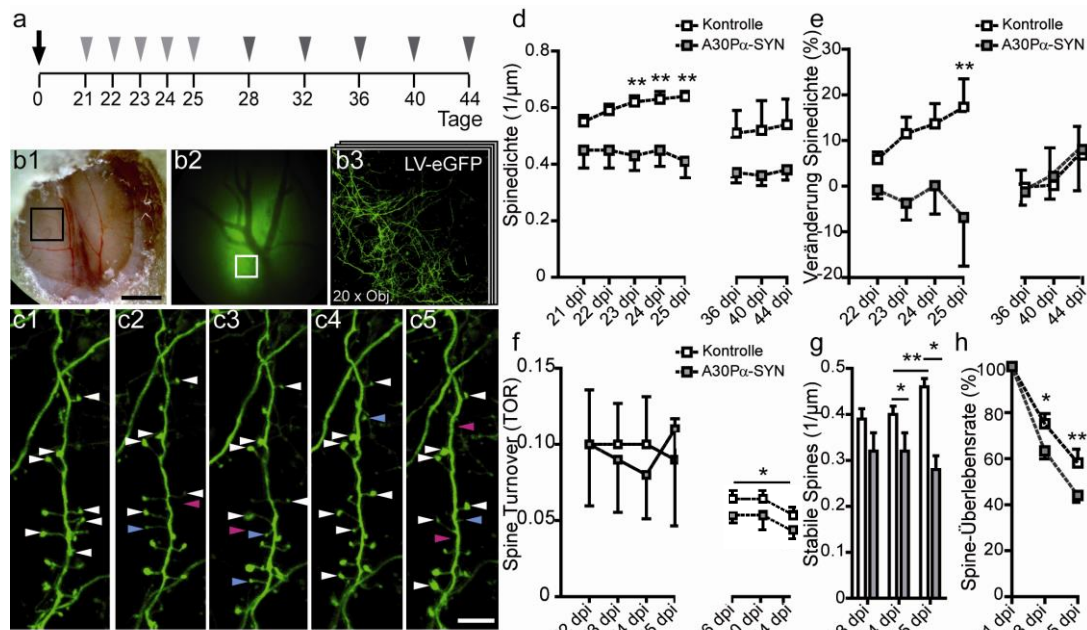


Abbildung 2.13: Verringerte Spinedichte und Spinestabilität in adult-geborenen Körnerzellen von A30P α-SYN Mäusen *in vivo*. (a) Schema des experimentellen Vorgehens, das die Zeitpunkte der Virusinjektion und Fensterimplantation über dem Riechkolben (schwarzer Pfeil), gefolgt von der *in vivo* Zwei-Photonen-Mikroskopie in zwei Kohorten von Mäusen (hell- und dunkelgraue Pfeilspitzen) darstellt. (b1-3) Experimentelles Setup für die chronische Zwei-Photonen-Mikroskopie von eGFP-exprimierenden adult-geborenen Körnerzellen durch ein *open-skull* kraniales Fenster über beiden Riechkolben. (b1) Eine Rückansicht der Kraniotomie mit einer schwarzen Box, welche die dargestellte Region in (b2) zeigt, in der deutlich die Schatten der Blutgefäße sichtbar sind. Maßstab - 1 mm (b1). (b3) Niedrige Auflösung einer zwei-photonen-mikroskopischen Aufnahme der Interessenregion mit eGFP-markierten lebenden Dendriten. (c1-5) Zeitserien eines typischen dendritischen Abschnittes der adult-geborenen Körnerzellen in der externen plexiformen Schicht (21-25 dpi). Pfeilspitzen deuten auf stabile (weiß), gewonnene (blau) und verlorene (magenta) Spines. Maßstab - 5 μm . (d) Quantifizierung der dendritischen Spinedichte in adult-geborenen Körnerzellen zu verschiedenen Zeitpunkten in Kontrolle (Wildtyp) und A30P α-SYN Mäusen (erste Kohorte: $n=8$; zweite Kohorte: $n=9$). (e) Zusammenfassendes Diagramm stellt die schrittweise prozentuale Veränderung in der dendritischen Spinedichte relativ zur ersten Mikroskopiesitzung in Kontrolle (Wildtyp) und A30P α-SYN dar. (f-h) Graphische Darstellung des dendritischen Spineumsatzes (f): erste Kohorte: $n=8$; zweite Kohorte: $n=9$; (g) Spine Stabilität (erste Kohorte, $n=8$) und (h) Spine-Überlebensrate (erste Kohorte, $n=8$). Hinweis: Anteil an überlebenden Spines wird relativ zur ersten Mikroskopiesitzung angegeben, welche als 100% angenommen wird. $*p<0,05$; $**p<0,01$; einfaktorielle Varianzanalyse mit Tukey-Kramer post-hoc Test (f); zweifaktorielle Varianzanalyse mit Bonferroni post-hoc Test (d,e,f,g,h).

Interessanterweise zeigte die Untersuchung des Spineumsatz zwischen 21 und 25 dpi relative stabile Werte für beide Genotypen (Abbildung 2.13f), während die Analyse der Spinestabilität eine Reduktion in Parkinsonmäusen im Vergleich zur Kontrolle offenbarte

($0,40 \pm 0,05$ Spines/ μm vs. $0,32 \pm 0,04$ Spines/ μm 23 dpi und $0,46 \pm 0,04$ Spines/ μm vs. $0,28 \pm 0,03$ Spines/ μm 25 dpi; $p < 0,05$; Abbildung 2.13g). Diese Beobachtung wurde durch den Vergleich der Überlebensrate von dendritischen Spines in beiden Genotypen weiter bestätigt (Abbildung 2.13h). Während in der Kontrolle $58,1 \pm 3,0\%$ der an 21 dpi gezählten Spines immer noch nach 25 dpi, vorhanden waren, war dieser Wert mit $44,0 \pm 1,5\%$ deutlich geringer in den A30P α -SYN Mäusen ($p < 0,01$). Ähnliche Experimente zur Analyse der dendritischen Spinedynamik in der zweiten Kohorte von Mäusen zwischen 36-44 dpi zeigte keine weiteren Änderungen der Spinedichte in der Kontrolle und A30P α -SYN Mäusen (44 dpi; $0,51 \pm 0,07$ Spines/ μm , $n=4$ Mäuse vs. $0,37 \pm 0,04$ Spines/ μm ; $n=5$ Mäuse; $p > 0,05$; Abbildung 2.13d,e). Hier wurde eine schrittweise Abnahme des Spineumsatz in beiden Gruppen gemessen ($p < 0,05$; Abbildung 2.13f). Zusammenfassend zeigen diese *in vivo* Daten eine Beeinträchtigung des Zugewinns und der Stabilität von dendritischen Spines von adult-geborenen Körnerzellen in den A30P α -SYN Mäusen, bedingt durch eine signifikant verminderte Überlebensrate neu aufkeimender Spines. Als Folge der verringerten Spineplastizität wurde eine mangelnde synaptische Integration der neuen Körnerzellen in das bereits bestehende neuronale Netzwerk des Riechkolbens beobachtet, die wahrscheinlich für das reduzierte Überleben dieser Nervenzellen in den Parkinsonmäusen verantwortlich ist.

2.6.3 Spinemorphologie

Dendritische Spines sind äußerst dynamische Strukturen, die sich in Abhängigkeit von Lernvorgängen, aber auch unter pathologischen Bedingungen, verändern (Bhatt et al., 2009). Eine abweichende Spinemorphologie ist damit ein charakteristisches Merkmal neurologischer Krankheiten, wobei die Spineform eng mit der Funktion der Synapse verknüpft ist (Yuste und Bonhoeffer, 2001; Villalba und Smith, 2010). Zudem stellt die Spinemorphologie eine breit akzeptierte Messgröße für die synaptische Stärke und Plastizität dar (Kopec und Malinov, 2006; Roberts et al., 2010).

Um die synaptische Kapazität von adult-geborenen Körnerzellen in Kontrolle (Wildtyp; $n=416$ Spines) und A30P α -SYN Mäusen ($n=223$ Spines) zu beschreiben, wurden die mittels intravitaler Zwei-Photonen-Mikroskopie aufgenommenen Spines (28 dpi) in Imaris rekonstruiert (Abbildung 2.14a; Jung et al., 2011), und anhand der Parameter Spinekopfvolumen, -kopfbreite und -halsbreite in die drei Klassen *thin* (dünne), *stubby* (stämmige) und *mushroom* (pilzförmige) eingeteilt (Abbildung 1.8b; Peters und Kaiserman-Abramof, 1970; Harris et al., 1992). Wie erwartet, wiesen die adult-geborenen Körnerzellspines eine breite strukturelle Heterogenität auf, die alle drei morphologische Gruppen beinhaltete (Abbildung 2.14a,b). Die Quantifizierung der Spineklassen ergab eine Mehrheit an *mushroom* Spines ($p < 0,05$), gefolgt von einem

kleineren Anteil an *thin* und *stubby* Spines in beiden Testgruppen (Abbildung 2.14c). Im direkten Vergleich der Genotypen wurde kein signifikanter Unterschied der einzelnen Spineformen nachgewiesen (Kontingenzanalyse; Chi-Square Test; $p > 0,05$). Die Quantifizierung der Spinekopfbreite auf adult-geborenen Körnerzellendriten zeigte einen Trend in Richtung höherer Werte in A30P α -SYN Mäusen ($0,52 \pm 0,02$ vs. $0,46 \pm 0,01$; $n=14$ und 18 Dendriten; A30P α -SYN und Kontrolle; $p=0,08$; Abbildung 2.14c) bei unveränderter Spinelänge ($6,4 \pm 0,2$ vs. $6,1 \pm 0,2$; $p > 0,05$; Abbildung 2.14d).

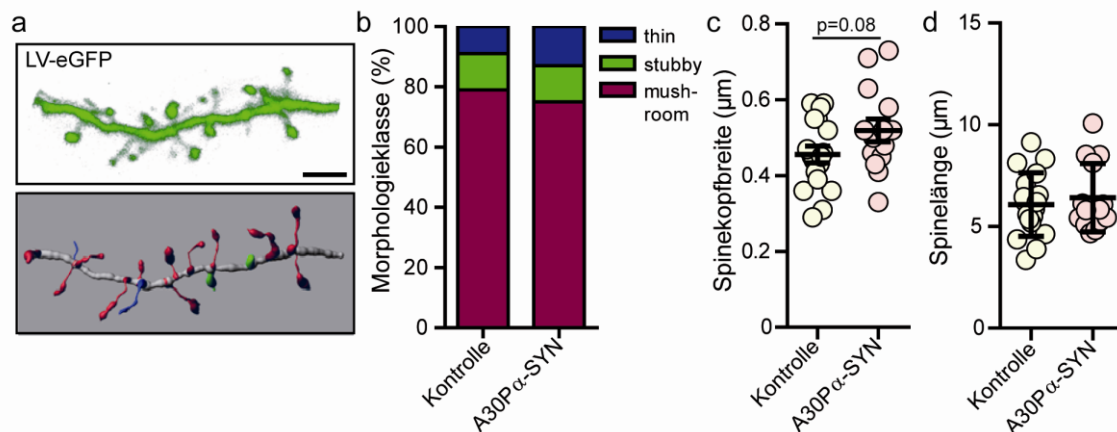


Abbildung 2.14: Unveränderte Spinemorphologie in adult-geborenen Körnerzellen von A30P α -SYN Mäusen. (a) Beispiel eines hochauflösenden LV-eGFP markierten apikalen Körnerzellendriten (28 dpi): *in vivo* zwei-photonen-mikroskopische z-Projektion, inklusive dessen morphologische Rekonstruktion. Maßstab - 5 μ m. Einzelne Spines wurden semi-automatisch nachgezeichnet und unterschiedliche Spineformen in *thin* (blau), *stubby* (grün) oder *mushroom* (magenta) entsprechend der automatisch berechneten Parameter Spinelänge, Spinekopfbreite und Spinehalsbreite klassifiziert. (b) Quantifizierung der Spines anhand der Anteile an den drei Morphologieklassen in 6 Monate alten Kontrolle (Wildtyp; $n=416$ Spines) und A30P α -SYN Mäusen ($n=223$ Spines). Quantitative Darstellung der (c) Spinekopfbreite und (d) Spinelänge auf adult-geborenen apikalen Körnerzellendriten von Kontrolle (Wildtyp; $n=18$ Dendriten) und A30P α -SYN Mäusen ($n=14$ Dendriten). Hinweis: Es wurde ein Trend in Richtung einer größeren Spinekopfbreite in A30P α -SYN Mäusen bestimmt. Chi-Square Test (b); Studentischer *t*-Test (c,d).

2.7 Quantitative Bestimmung von inhibitorischen Synapsen und Glutamatrezeptoren in adult-geborenen Körnerzellen von A30P α -SYN Mäusen

Im Folgenden wurde die Hypothese einer defekten synaptischen Integration von neuen Körnerzellen genauer untersucht. Alle den Körnerzellen zugeschriebenen Funktionen hängen von der dendrodendritischen Synapse ab, da diese den einzigen Output von Körnerzellen darstellt (Price und Powell, 1970). Dendrodendritische Synapsen funktionieren bidirektional zwischen dem apikalen Körnerzellendriten, auf dem ein ungewöhnlich großer Spinekopf sowohl Prä- als auch Postsynapse beherbergt, und dem lateralen Dendriten von Mitral-/Tufted-Zellen (Rall et al., 1966). Direkte Ausschüttung von Glutamat durch Mitral-/Tufted-Zellen bewirkt den Ioneneinstrom durch AMPA- und NMDA-Rezeptoren, der wiederum die Abgabe von GABA aus dem Körnerzellspine

veranlasst (Einleitung, Abbildung 1.3a). Diese laterale Hemmung dient der Filterung und Diskriminierung von Gerüchen im Riechkolben (Lepousez et al., 2013).

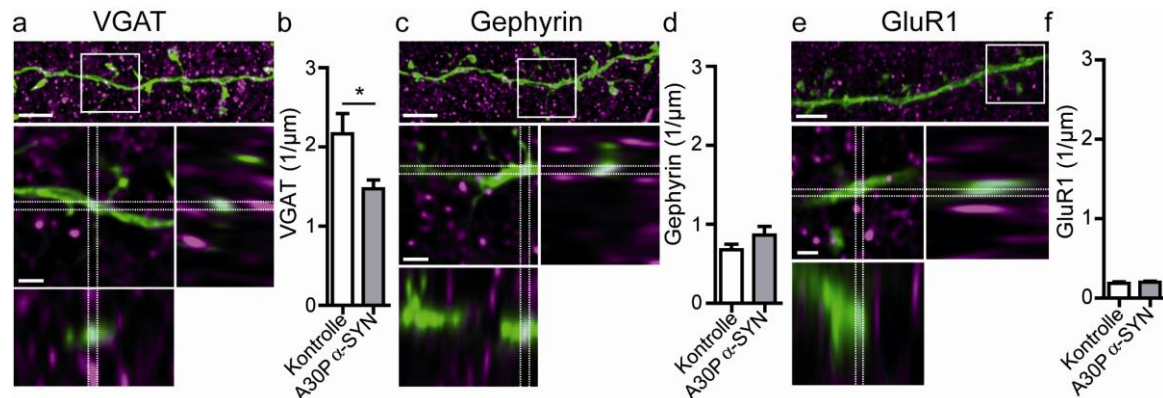


Abbildung 2.15: Verlust von präsynaptischen GABAergen Komponenten in apikalen Körnerzellendriten von A30P α-SYN Mäusen. (a,c,e) Repräsentative konfokale z-Projektionen von LV-transduzierten apikalen Dendritenabschnitten von adult-geborenen Körnerzellen (28 dpi, grün), die mit (a) VGAT, (c) Gephyrin bzw. (e) der GluR1-Untereinheit des AMPA-Rezeptors (magenta) gegengefärbt wurden. Maßstab - 5 µm. Die Seitenansichten illustrieren einen Kolokalisationspunkt (weiß) von markiertem Protein mit eGFP-positiven Dendritenabschnitten: vergrößert von der definierten Region darüber (weiße Rechtecke). Maßstab - 1,5 µm. Diagramme zeigen die Anzahl an (b) VGAT, (d) Gephyrin und (f) GluR1 Kolokalisationspunkten pro µm Körnerzellendendrit in Kontrolle (Wildtyp) und A30P α-SYN Mäusen (n=5 Mäuse pro Gruppe). *p<0,05; Studentischer t-Test.

Um zu prüfen, welchen Einfluss die veränderte Entwicklung der dendritischen Spines von adult-geborenen Körnerzellen in A30P α-SYN Mäusen auf die synaptische Ausrüstung an dieser dendrodendritischen Verbindung hat, wurden die Level an den GABAergen synaptischen Markern VGAT (präsynaptisch) und Gephyrin (postsynaptisch) in den Dendriten von Kontrolle (Wildtyp) und A30P α-SYN Mäusen untersucht (Material und Methoden, Abbildung 4.10). Wie in Abbildung 2.15a,b sichtbar ist, war die Anzahl an VGAT-positiven Clustern, die mit LV-eGFP-markierten, apikalen Dendriten kolokalisierten, in den Parkinsonmäusen beträchtlich erniedrigt ($1,5 \pm 0,1$ 1/µm, n=6 Mäuse, vs. $2,2 \pm 0,3$ 1/µm, n=5 Mäuse; p<0,05; Abbildung 2.15a,b). Eine Analyse der Gephyrincluster zeigte eine gleichmäßige Verteilung dieses postsynaptischen Markerproteins zwischen beiden Genotypen ($0,7 \pm 0,1$ 1/µm, n=4 Mäuse vs. $0,9 \pm 0,1$ 1/µm, n=6 Mäuse; Kontrolle und A30P α-SYN; p>0,05; Abbildung 2.15c,d), was auf eine selektive Schädigung der präsynaptischen Bestandteile von dendrodendritischen GABAergen Synapsen hinweist. Weiter wurde die Expression von AMPA-Glutamatrezeptoren analysiert, indem die Anzahl an GluR1-markierten Rezeptorclustern auf eGFP-positiven Dendriten quantifiziert wurde (Abbildung 2.15e,f), die ebenfalls eine ähnliche Expression in beiden Genotypen zeigte ($0,19 \pm 0,04$ 1/µm, n=5 Mäuse vs. $0,20 \pm 0,03$ 1/µm, n=5 Mäuse, Wildtyp und A30P α-SYN; p>0,05). Diese Beobachtungen indizieren eine Diskrepanz zwischen prä- und postsynaptischen

GABAergen Bestandteilen von dendrodendritischen Synapsen in A30P α -SYN Mäusen. In Anbetracht der erniedrigten Spinedichte auf adult-geborenen Körnerzellendriten der transgenen Mäuse, deuten diese Ergebnisse außerdem darauf hin, dass ihre Spines mehr GluR1 für die synaptische Erregungsübertragung zur Verfügung haben.

2.8 Elektrophysiologische Charakterisierung von adult-geborenen Körnerzellen

2.8.1 Intrinsische Eigenschaften von adult-geborenen Körnerzellen in A30P α -SYN Mäusen

Um funktionelle Auswirkungen von A30P α -SYN auf die adult-geborenen Körnerzellen zu untersuchen wurden elektrophysiologische Messungen von eGFP-markierten Nervenzellen in akuten Schnitten durchgeführt (Abbildung 2.16). Die passiven Eigenschaften der Körnerzellmembran wurden unter pharmakologischer Hemmung von ionotropen glutamatergen und GABAergen Inputs mit Kynurinsäure und Picrotoxin gemessen, während das Feuern von Aktionspotentialen durch depolarisierende Ströme induziert wurde, die vor und nach pharmakologischer Behandlung appliziert wurden. Ganzzell-Ableitungen mithilfe der Patch-Clamp-Technik zeigten, dass die Mehrzahl der eGFP-positiven Körnerzellen elektrisch stumm waren (8/8 Kontrolle und 10/12 A30P α -SYN), jedoch durch stetige, kurze depolarisierende Ströme in einen kontinuierlichen Feuermodus gebracht werden konnten (Abbildung 2.16). Weder das Ruhepotential ($-64,2 \pm 3,6$ mV vs. $-59,4 \pm 2,8$ mV; $p=0,3$) noch die Amplitude des Schwellenwertstromes zur Induktion der Feueraktivität ($11,1 \pm 2,0$ pA vs. $10,0 \pm 1,5$ pA; $p=0,65$) unterschieden sich zwischen beiden Genotypen ($n=10$ und $n=8$, Kontrolle und A30P α -SYN). Nach Blockade von erregenden und hemmenden Eingangssignalen waren die Schwellenwerte der Feuerrate ($4,4 \pm 2,0$ Hz vs. $5,3 \pm 1,8$ Hz) und die Variabilität der Intervalle zwischen den einzelnen Aktionspotentialen ('Spikes'; Variationskoeffizient (CV) = $0,15 \pm 0,03$ vs. $0,13 \pm 0,06$) und Gruppen vergleichbar. Interessanterweise war die Variabilität der 'Inter-Spike-Intervalle' in den A30P α -SYN Körnerzellen größer im Vergleich zu Kontrollen, wenn nur die erregenden Eingangssignale aufgezeichnet wurden (CV = $0,31 \pm 0,06$ vs. $0,43 \pm 0,05$; $p < 0,05$). Um zu prüfen, ob dieser Unterschied auf einen größeren Einfluss der erregenden synaptischen Inputs auf die Spannungsdynamiken adult-geborener Körnerzellen zurückzuführen ist, wurde zunächst die aktive Empfindlichkeit der Zellen auf einem hyperpolarisierten Niveau verglichen ($-65,0 \pm 0,1$ mV). Wie Abbildung 2.16 b,f zeigt, feuerten die Neurone der A30P α -SYN Mäuse leichter Aktionspotentiale als Kontrollmäuse, da ihre Schwellenwertströme niedriger waren ($18,0 \pm 1,8$ pA vs. $25,5 \pm 1,9$ pA; $p < 0,05$). Der ähnliche

Spannungsschwellenwert für die Generierung von Aktionspotentialen ($-37,6 \pm 0,7$ mV vs. $-38,2 \pm 0,5$ mV; $p > 0,05$) und Spike-Amplituden ($67,2 \pm 2,4$ mV vs. $69,1 \pm 2,1$ mV; $p > 0,05$) in beiden Gruppen lässt auf veränderte passive Eigenschaften als Ursache für die erhöhte Empfindlichkeit der A30P α -SYN Körnerzellen rückschließen. Dies wurde durch Messungen der Membrankapazität und des Eingangswiderstandes von Kontrolle (Wildtyp) und A30P α -SYN Neuronen ($n=16$ und 14) bestätigt (Abbildung 2.16b-e). Der Eingangswiderstand von A30P α -SYN Körnerzellen war höher ($1,9 \pm 0,1$ G Ω vs. $1,5 \pm 0,2$ G Ω ; $p < 0,05$), während ihre Membrankapazität deutlich erniedrigt war ($10,2 \pm 0,5$ pF vs. $12,6 \pm 1,0$ pF; $p < 0,05$). Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die Körnerzellen der Parkinsonmäuse aufgrund ihrer unterentwickelten Dendriten elektrisch kompakter und dadurch leichter erregbar sind.

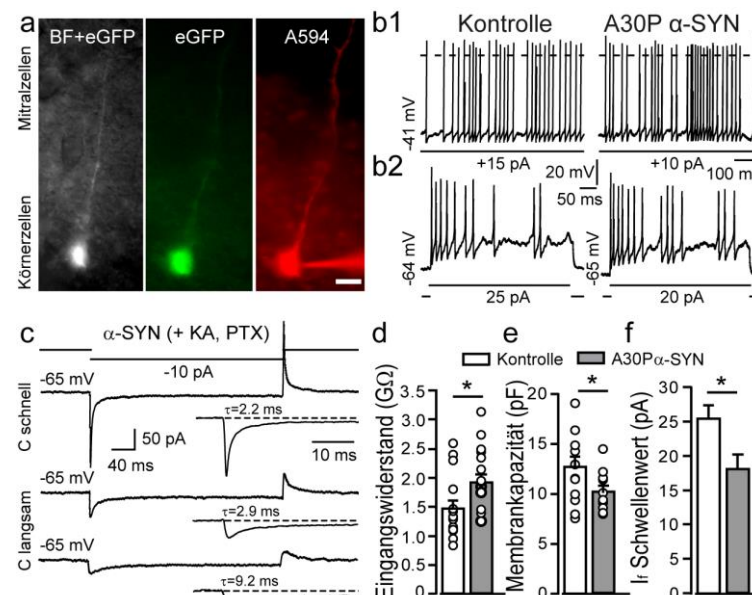


Abbildung 2.16: Erhöhte Empfindlichkeit von adult-geborenen Körnerzellen auf direkte somatische Inputs in A30P α -SYN Mäusen. (a) Repräsentative Bilder von adult-geborenen Körnerzellen in horizontalen Schnitten des Riechkolbens: Überlagerung von eGFP und Hellfeldaufnahme (links), eGFP-positive Körnerzelle vor und nach dem Beladen mit Alexa594 (mittig, rechts) über die Patchpipette. Maßstab - 10 μ m. (b1) Anhaltende Feueraktivität der adult-geborenen Körnerzellen, die durch ständige, über dem normalen Schwellenwert liegende, depolarisierende Ströme induziert wurde (200 μ M Picrotoxin; PTX). Episodenweise auftretendes, impulsartiges Feuern war charakteristisch für diese Zellen in A30P α -SYN Mäusen. (b2) Repräsentatives induziertes Feuern von Aktionspotentialen adult-geborener Körnerzellen aus hyperpolarisiertem Potential (nahe an -65 mV) zeigt eine erhöhte Empfindlichkeit der Zellen aus A30P α -SYN Mäusen auf direkte depolarisierende Stimuli. Hinweis: Größere Amplitude der injizierten Ströme und niedrige Anzahl von Aktionspotentialen in der Kontrolle (Wildtyp). (c-e) Bewertung der passiven Eigenschaften von adult-geborenen Körnerzellen: (c) kapazitive Ströme in Kontrolle. Elektrische Antwort auf hyperpolarisierende elektrische Spannungstakte (5 mV) vom Ruhepotential aus. Jede Spur entspricht dem Mittelwert von fünf Durchläufen. Nicht-kompensierte kapazitive Ströme und verbleibende Ströme nach Unterbrechung der schnellen Kapazität (Elektrode) (oben und mittig). Unten - kapazitive Ströme nach Unterbrechung der langsamen Kapazität (Zelle) und Datenreihe der Widerstandskompensation (80%). (d) Balkendiagramme von (d) Eingangswiderstand, (e) Membrankapazität und (f) Stromschwellenwert zur Induktion von Aktionspotentialen (I_t) aus dem hyperpolarisierenden Ruhepotential in den Körnerzellen beider Genotypen. Offene Kreise stellen die Ergebnisse von einzelnen Nervenzellen da. * $p < 0,05$; Studentischer t -Test.

2.8.2 Erregende synaptische Übertragung von Körnerzellen in A30P α -SYN Mäusen

Für die Untersuchung von funktionellen Auswirkungen der verminderten Spineplastizität auf die erregende synaptische Übertragung in neuen A30P α -SYN Körnerzellen wurden ihre spontanen erregenden postsynaptischen Ströme (sEPSC) unter Hemmung der inhibitorischen synaptischen Übertragung mit Picrotoxin gemessen (Abbildung 2.17). Obwohl die Übertragung von Ladungen durch aktivierte AMPA-Rezeptoren den Hauptmechanismus der spontanen schnellen glutamatergen Inputs in Neuronen darstellt, wurde ein essentieller Beitrag von NMDA-Rezeptor-abhängigen Strömen beschrieben (Espinosa und Kavalali, 2009). Der Vergleich der sEPSCs von Körnerzellen aus Kontrollmäusen (Wildtyp) und A30P α -SYN Tieren zeigte keinen Unterschied in ihrer Frequenz ($8,0 \pm 1,2$ Hz, $n=8$ Neurone vs. $5,9 \pm 0,9$ Hz, $n=12$ Neurone; $p=0,16$) oder Amplitude ($23,2 \pm 3,7$ pA vs. $22,8 \pm 4,6$ pA; $p=0,95$; Abbildung 2.17a-c), wobei jedoch ein klarer Trend zu niedrigeren Frequenzen in den transgenen Neuronen messbar war. Dieses Ergebnis war überraschend in Anbetracht der deutlich erniedrigten Spinedichte in adult-geborenen Körnerzellen der A30P α -SYN Mäuse.

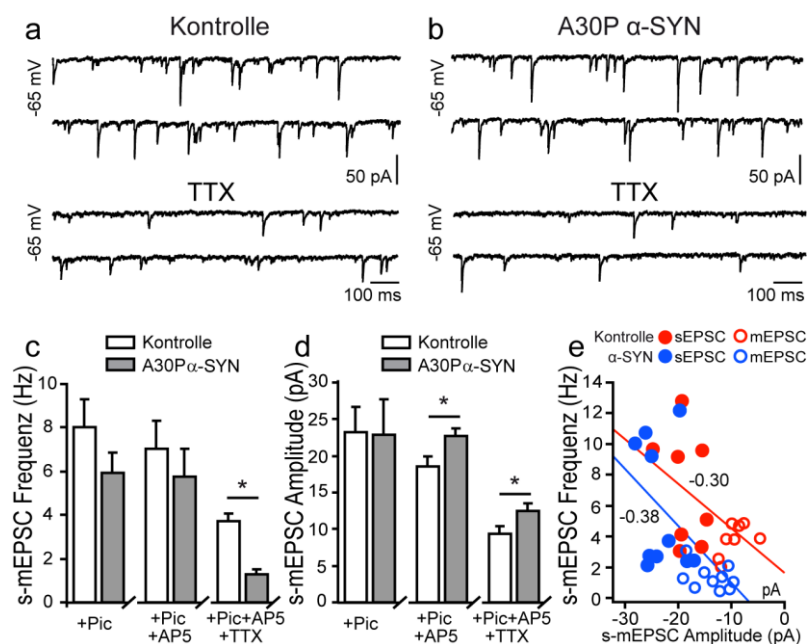


Abbildung 2.17: Erregende postsynaptische Ströme in Körnerzellen sind seltener, zeigen jedoch größere Amplituden in A30P α -SYN Mäusen. (a,b) Vergleich der sEPSCs (gesamt, obere Spuren) und mEPSCs (Tetrodotoxin (TTX)-resistent, untere Spuren) von adult-geborenen Körnerzellen in 6 Monate alten Kontrolle (Wildtyp) und A30P α -SYN Mäusen. (c,d) Balkendiagramme zeigen spontane und mini (s-m) EPSC Frequenz (c) und Amplitude (d) unter der Hemmung inhibitorischer Inputs mit Picrotoxin (Pic; 200 μ M), gefolgt von der Hemmung von NMDA Rezeptoren mit D-AP5 (50 μ M) und der weiteren Eliminierung des Aktionspotential-abhängigen Anteils der sEPSCs mit Tetrodotoxin (1 μ M). Hinweis: Geringere Frequenz und höhere Amplitude des Tetrodotoxin-resistenten Anteils an EPSCs (sEPSCs) in adult-geborenen Körnerzellen der A30P α -SYN Mäuse. (e) Graphische Darstellung des Zusammenhangs von AMPA-Rezeptor vermittelten sEPSCs und mEPSCs in einzelnen Körnerzellen der beiden Genotypen. Die steilere Neigung des Zusammenhangs von Amplitude und Frequenz zwischen sEPSCs und mEPSCs deutet auf eine geringere Sensitivität der sEPSCs Amplitude auf TTX in A30P α -SYN Mäusen. * $p < 0,05$; Studentischer t -Test.

Die Analyse der sEPSCs nach Blockade von NMDA-Rezeptor-vermittelten Strömen mit dem selektiven Antagonisten D-AP5 zeigte keine wesentlichen Veränderungen in der sEPSC Frequenz ($7,0 \pm 1,3$ Hz und $5,7 \pm 1,3$ Hz; Kontrolle und A30P α -SYN). Interessanterweise jedoch verursachte eine solche Hemmung eine beträchtliche Verminderung der Amplitude der sEPSC Ströme in den Körnerzellen der Kontrolle (Wildtyp), nicht jedoch in transgenen α -SYN Mäusen ($18,4 \pm 1,2$ pA vs. $22,7 \pm 1,2$ pA). Signifikante Unterschiede in der Frequenz und Amplitude der zwei Genotypen konnten im Vergleich der AMPA-vermittelten, erregenden postsynaptischen Minaturströme (mEPSCs) nach Blockade der Aktionspotential-abhängigen synaptischen Ströme durch Tetrodotoxin (TTX) bestimmt werden. In Übereinstimmung mit den morphologischen Messdaten wiesen adult-geborene A30P α -SYN Körnerzellen stark verminderte mEPSCs Frequenzen ($3,7 \pm 0,4$ Hz, n=8 Neurone vs. $1,3 \pm 0,2$ Hz, n=10 Neurone; $p < 0,01$) bei gleichzeitig deutlich erhöhter Amplitude auf ($12,1 \pm 0,8$ pA vs. $9,2 \pm 0,8$ pA; $p < 0,05$; Abbildung 2.17d,e). Folglich scheint die Verminderung der Frequenz von AMPA-Rezeptor-vermittelten mEPSCs, begleitet von einer signifikant erhöhten Amplitude, auf die reduzierte dendritische Spinedichte der adult-geborenen Körnerzellen zurückzuführen zu sein.

2.9. Pharmakologische Hemmung der A30P α -SYN-induzierten Effekte auf adult-geborene Neurone

Um den pathologischen Veränderungen in adult-geborenen Neuronen entgegenzuwirken, wurde im letzten Teil der Arbeit ein therapeutischer Versuch zur pharmakologischen Hemmung der A30P α -SYN Aggregation durchgeführt. Dazu wurde der Wirkstoff Anle138b ausgewählt, der *in vitro* und *in vivo* die Bildung von α -SYN Aggregaten hemmt, und somit die Entstehung von toxischen Proteinspezies unterbindet (Wagner et al., 2013). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass Anle138b das Überleben von α -SYN überexprimierenden Mäusen verlängert (Wagner et al., 2013). Der Wirkstoff kann die Blut-Hirn-Schranke gut passieren. So ist bekannt, dass Anle138b 4 h nach oraler Applikation von 1 mg Wirkstoff in Erdnussbutter eine Konzentration von 34,1 nmol/g im Gehirn aufweist (Wagner et al., 2013), einen deutlich höheren Wert als andere Verbindungen mit ähnlicher Struktur erreichen. Chemisch betrachtet ist Anle138b [3-(1,3-benzodioxol-5-yl)-5-(3-bromophenyl)-1H-pyrazole] eine polyphenolische Verbindung aus der Gruppe der Flavonoide (Abbildung 2.18a; Belitz et al., 2007), die natürlicherweise in einer Vielzahl an Früchten, Gemüse sowie grünem und schwarzem Tee vorkommen, und ein breites Spektrum an gesundheitsförderlichen Eigenschaften aufweisen (Manach et al., 2005; Fraga, 2007). In einer klinischen Langzeitstudie wurden

2 Ergebnisse

protektive Effekte von Teepolyphenolen bei Parkinsonpatienten beschrieben (Hu et al., 2007).

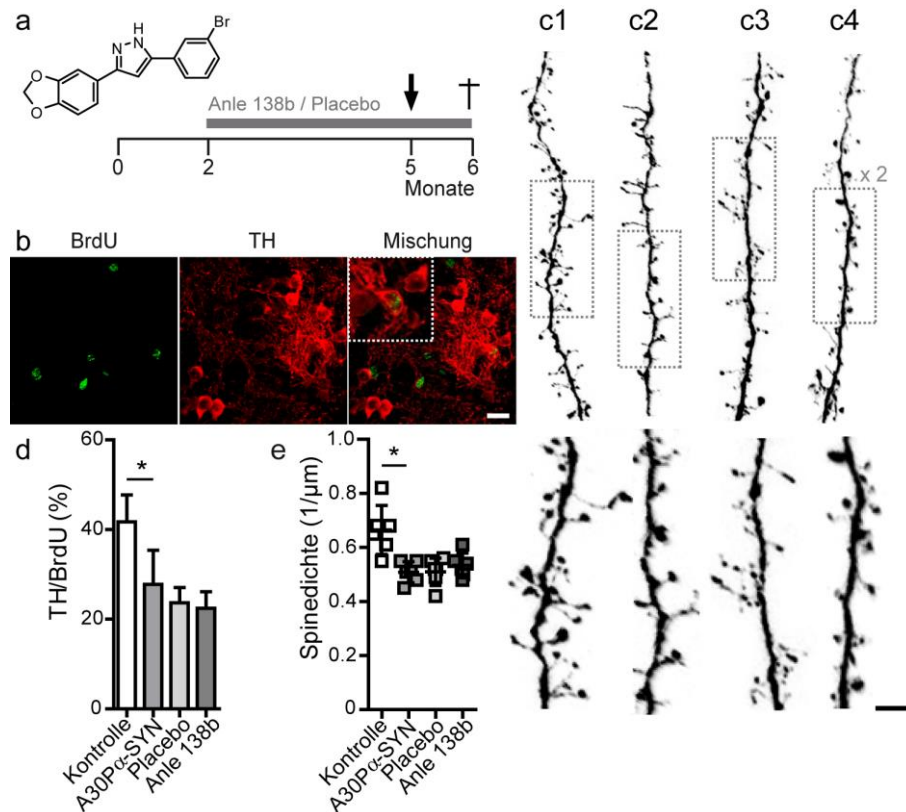


Abbildung 2.18: Therapeutische Effekte von Anle138b auf adult-geborene Neurone in A30P α-SYN Mäusen. (a) Strukturformel von Anle138b [3-(1,3-benzodioxol-5-yl)-5-(3-bromophenyl)-1H-pyrazole]: chemisch betrachtet ist Anle138b eine polyphenolische Verbindung aus der Gruppe der Flavonoide, die natürlicherweise in einer Vielzahl an Früchten, Gemüse sowie grünem und schwarzem Tee vorkommen, und ein breites Spektrum an gesundheitsförderlichen Eigenschaften aufweisen. Ab dem Alter von 2 Monaten wurden zwei Gruppen von A30P α-SYN Mäusen mit Anle138b-angereicherten Futterpellets bzw. unangereicherten Futterpellets ad libidum gefüttert. Im Alter von 5 Monaten wurde beiden Testgruppen LV-eGFP in den linken RMS injiziert. Zusätzlich wurde den Mäusen an 5 hintereinander folgenden Tagen BrdU intraperitoneal verabreicht. Einen Monat später wurden die Tiere perfundiert und Gehirnschnitte zur quantitativen Analyse von neugeborenen Neuronen (BrdU; rechte Hemisphere) und ihrer dendritischen Spinedichte (LV-eGFP; linke Hemisphere) gefärbt. (b) Konfokale Bildprojektionen von dopaminergen (TH, rot) adult-geborenen periglomerulären Neuronen (BrdU, grün) und der Überlagerung mit einer vergrößerten Ansicht einer für beide Marker positiven Zelle. Maßstab - 10 µm. Repräsentative konfokale Bildprojektionen von Dendriten von (c1) Kontrollen (Wildtyp), (c2) unbehandelten A30P α-SYN Mäusen, (c3) Placebo-gefütterten A30P α-SYN Mäusen und (c4) Anle138b-therapierten A30P α-SYN Mäusen, einschließlich ihrer vergrößerten Abschnitte mit dendritischen Spines. Maßstab - 5 µm. (d) Quantifizierung des Anteils an dopaminergen adult-geborenen Neuronen (TH/BrdU; %) in Kontrolle (Wildtyp, n=3), unbehandelten A30P α-SYN Mäusen (n=4), Placebo-gefütterten A30P α-SYN Mäusen (n=4) und Anle138b-therapierten A30P α-SYN Mäusen (n=5) (e) Quantifizierung der dendritischen Spinedichte in allen vier Versuchsgruppen (n=5 bzw. 6). *p<0,05; einfaktorielle Varianzanalyse mit Tukey-Kramer post-hoc Test.

Anle138b wurde in einem Zeitraum von insgesamt 4 Monaten über das Futter verabreicht. Dazu wurden A30P α-SYN Mäuse ab einem Alter von 2 Monaten mit Anle138b-angereicherten Futterpellets (Versuchsgruppe) bzw. unangereicherten Futterpellets (Placebogruppe) *ad libidum* gefüttert. Im Alter von 5 Monaten wurde den

Mäusen an 5 hintereinander folgenden Tagen BrdU (50 mg/kg Körpergewicht; i.p.) verabreicht (Abbildung 2.18a). Außerdem wurde in den RMS der linken Hemisphere LV-eGFP injiziert. Einen Monat später wurden die Mäuse unter hochdosierter Narkose perfundiert und ihre Riechkolben für die immunhistochemische Analyse entnommen (Abbildung 2.18b,c). Der Therapieeffekt auf das Überleben von adult-geborenen dopaminergen Neuronen, die in transgenen A30P α -SYN Mäusen eine verminderte Integrationsstabilität und erhöhte Sterberate aufwiesen (Abbildung 2.11), wurde durch die Quantifizierung von TH/BrdU doppelt-positiven Zellen bestimmt. Zwischen Anle138b-behandelten A30P α -SYN Mäusen ($22,5 \pm 1,6\%$) und der unbehandelten Placebogruppe ($23,7 \pm 1,7\%$; $p > 0,05$) waren keine Unterschiede in dem prozentualen Anteil an neuen dopaminergen Neuronen zu verzeichnen (Abbildung 2.18b,d). Vielmehr wiesen beide Testgruppen eine deutlich verminderte Menge an Nervenzellen auf im Vergleich zum Wildtyp ($41,7 \pm 3,5\%$; $p < 0,05$).

Bei der quantitativen Analyse von dendritischen Körnerzellspines (28 dpi) konnte ebenfalls keine positive Therapiewirkung nachgewiesen werden, da sowohl Anle138b-behandelte A30P α -SYN Mäuse ($0,53 \pm 0,02$ Spines/ μm) als auch unbehandelte Mäuse ($0,51 \pm 0,02$ Spines/ μm) ($p > 0,05$) eine erniedrigte Spinedichte im Vergleich zum Wildtyp ($0,66 \pm 0,04$ Spines/ μm ; $p < 0,05$; Abbildung 2.18c,e) zeigten. Insgesamt konnte der Zustand von adult-geborenen Neuronen im Riechkolben von A30P α -SYN Mäusen durch die Behandlung mit Anle138b nicht verbessert werden, da weder eine Wiederherstellung der Spinedichte noch eine gesteigerte Überlebensquote erreicht wurde.

3 Diskussion

3.1. Intravitale Zwei-Photonen-Mikroskopie des Riechkolbens

Für die *in vivo* Zwei-Photonen-Mikroskopie eignen sich oberflächlich gelegene Gehirnregionen, die noch innerhalb der maximalen Eindringtiefe des Zwei-Photon-Lasers von bis zu 1.000 μm in das Gewebe liegen (Theer et al., 2003). Neben dem zerebralen Kortex (Holtmaat et al., 2009) ist der Riechkolben aufgrund seiner exponierten Lage eine ideale Gehirnregion (Adam und Mizrahi, 2011), um Veränderungen von neuronalen Strukturen im Zeitverlauf zu beobachten. Zusätzlich stellt der Bulbus olfactorius eine sehr attraktive Gehirnregion für die chronische Mikroskopie dar, da er aufgrund der adulten Neurogenese - der kontinuierlichen Eingliederung von neuen Nervenzellen in bestehende Netzwerke - eine außergewöhnlich hohe strukturelle Plastizität aufweist (Mizrahi, 2007).

Die intravitale Zwei-Photonen-Mikroskopie besitzt gegenüber *ex vivo* Untersuchungen zwei wesentliche Vorteile, welche die Methode zu einer wichtigen Technik in den Neurowissenschaften machen: (i) Zellstrukturen, wie beispielsweise dendritische Spines, können in ihrer natürlichen Umgebung aufgenommen werden. Dies ist insbesondere für neuronale Strukturen wichtig, da sie nur als integrierte Einheit im funktionierenden neuronalen Netzwerk ihre vollständigen physiologischen Eigenschaften aufweisen; (ii) Individuelle Strukturen können über einen langen Zeitraum mikroskopiert werden, um ihre Veränderungen nach physiologischer oder artifizieller Modifikation zu verfolgen. Unter den Limitationen dieser Methode ist der besonders hohe technische und zeitliche Aufwand zu nennen, der die zu erhebende Datenmenge pro Versuchstier oftmals einschränkt. Zudem schließt die begrenzte Eindringtiefe in das Gewebe die Analyse von tiefer gelegenen Gehirnregionen, wie der bei Morbus Parkinson betroffenen Substantia nigra oder dem Hippocampus, aus. Letztere Region ist insbesondere für die Aufklärung von Lernvorgängen, Gedächtnisfunktion und der Alzheimerschen Erkrankung von Interesse. Ein weiterer Kritikpunkt der verwendeten *in vivo* Mikroskopie ist der Einsatz von Anästhetika, wie Ketamin/Xylazin oder Isofluran, welche nachweislich einen Einfluss auf das Nervensystem haben (Liang et al., 2010), und unter anderem auch den Umsatz von dendritischen Spines in jungen Neuronen beeinflussen können (Duman und Li, 2012). Außerdem wurde gezeigt, dass Ketamin einen Effekt auf die Entwicklung von Dendritenbäumen und das Überleben von unreifen GABAergen Nervenzellen hat (Vutsits et al., 2006). Andere Studien konnten keine Effekte der Narkose auf die Entwicklung und die Dynamik dendritischer Spines feststellen (Yang et al., 2011). Um dieser möglichen Gefahr vorzubeugen, könnte man die Versuche auch in wachen, sich

bewegenden Mäusen durchführen (Dombeck et al., 2007). Um Effekte der Narkose zu kontrollieren, wurde in dieser Studie jede Messung an transgenen Mäusen mit der Aufzeichnung einer Kontrollgruppe (Wildtyp) verglichen, die den gleichen Versuchsbedingungen ausgesetzt war.

Durch die kombinierte Anwendung der *in vivo* Zwei-Photonen-Mikroskopie und der zeitkodierten Fluoreszenzmarkierung von adult-geborenen Neuronen des Riechkolbens mittels lentiviraler Transduktion wurden die gesamten Dendritenbäume, inklusive ihrer Spines, angefärbt und in einem bestimmten Entwicklungsstadium beobachtet (Mizrahi, 2007). Zusätzlich wurde die Technik der Intravitalmikroskopie mit elektrophysiologischen Methoden kombiniert, um funktionelle Konsequenzen der beobachteten strukturellen Veränderungen zu beleuchten. Anhand dieser beschriebenen Techniken wurden in der vorliegenden Arbeit die Auswirkungen von A30P α -SYN auf die strukturelle Plastizität von (i) dopaminergen periglomerulären Neuronen, und (ii) adult-geborenen Körnerzellsynapsen analysiert, die im Folgenden genauer diskutiert werden.

3.2 Verminderte Plastizität durch instabile Integration und vermehrtes Absterben von adult-geborenen Neuronen im Riechkolben

Um die Ursache für das vermehrte Absterben von adult-geborenen Nervenzellen mittels chronischer Intravitalmikroskopie genauer zu untersuchen, wurden dopaminerge periglomeruläre Neurone ausgewählt, da diese (i) bekanntlich in der Parkinsonschen Krankheit betroffen sind (Cookson et al., 2009), (ii) selektiv markiert werden können (Lindeberg et al. 2004), und (iii) eine oberflächliche Lage im Riechkolben aufweisen, wodurch sie mit der *in vivo* Zwei-Photonen-Mikroskopie gut zugänglich sind. Ihre Empfindlichkeit auf erhöhte Mengen an α -SYN im olfaktorischen Netzwerk (Abbildung 2.2) wurde auch in anderen Studien nachgewiesen, welche die Proliferation, Differenzierung, Signalwirkung und das Überleben dieser Zellen untersuchten (Winner et al., 2004, 2008; Marxreiter et al., 2009; Nuber et al., 2008). Eine mögliche Erklärung für die in allen Studien beobachtete erhöhte Sensitivität dopaminergener Neurone für α -SYN-assoziierte Toxizität stellt die Präsenz von Dopamin in diesen Neuronen dar. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass der Neurotransmitter über eine oxidative Reaktion an α -SYN bindet und dabei die Umwandlung von α -SYN Protofibrillen in Fibrillen hemmt (Conway et al., 2001). Somit reichern sich vermehrt toxische Protofibrillen in den dopaminergen Neuronen an. In anderen Studien wurde die Rolle von α -SYN in der Regulation der Dopaminbiosynthese beschrieben, die wiederum durch α -SYN Aggregation beeinträchtigt wird (Alerte et al., 2008). Obwohl der Zusammenhang von schädlichem α -SYN und dopaminergem Zelltod mehrfach beschrieben wurde, fehlt

3 Diskussion

bis heute eine schlüssige Erklärung für die erhöhte Anfälligkeit von dopaminergen Neuronen im Riechkolben und Mittelhirn. Wahrscheinlich ist hier ein Zusammenspiel unterschiedlichster Faktoren zu diskutieren (Obeso et al., 2010).

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Ablagerung von A30P α -SYN störend auf die stabile Integration der adult-geborenen Nervenzellen einwirkt und ihre Überlebensrate stark beeinflusst. Diese war in transgenen A30P α -SYN Mäusen um 23% verringert im Vergleich zum Wildtyp. In Abbildung 3.1 sind diese Beobachtungen zusammenfassend dargestellt.

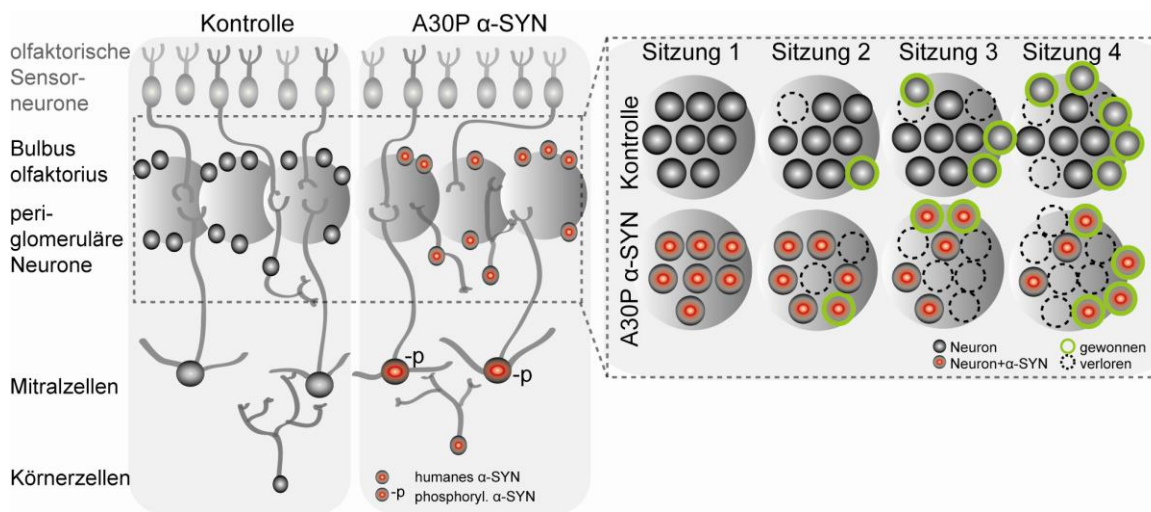


Abbildung 3.1: Integrationsmodell für adult-geborene Neurone in A30P α -SYN Mäusen. (links - Überblick) Adult-geborene periglomeruläre Neurone und Körnerzellen integrieren in das bereits bestehende neuronale Netzwerk des Riechkolbens um zur Riechfunktion beizutragen. In den Parkinsonmäusen erwartet die neuen Nervenzellen ein α -SYN überladenes Netzwerk (rot; erhöhte A30P α -SYN Expression) mit Pathologie-assoziiertem Phänotyp in Mitralzellen (-p: phosphoryliertes α -SYN), den wichtigsten, zentral gelegenen synaptischen Partner von periglomerulären Neuronen und Körnerzellen. (rechts - Ausschnitt aus der glomerulären Schicht) Die Untersuchung des Umsatzes von dopaminergen periglomerulären Zellen bietet einen ersten *in vivo* Beweis für eine reduzierte Überlebensspanne der adult-geborenen Neurone aufgrund einer instabilen Integration. Während in beiden Genotypen die gleiche Anzahl an Zellen den Zielort erreicht und vermutlich auch integriert (~10%; grüne Umrandung), zeigen die Parkinsonmäuse einen kontinuierlich höheren Zellverlust (~12%) als Kontrollen (~8%; gestrichelte Umrandung). Dabei beinhaltet der Umsatz an Zellen eine signifikant höhere Anzahl an ‚kurzlebigen‘ periglomerulären Neuronen, die in einer Mikroskopiesitzung neu erscheinen und in der darauffolgenden unmittelbar wieder verschwinden. Dieses Ungleichgewicht resultiert in einem verminderten Nettozugewinn an Nervenzellen zu der glomerulären Schicht über die Zeit in den Parkinsonmäusen. Diese Ergebnisse zeigen, dass toxische α -SYN Akkumulation - sowohl innerhalb der betroffenen Zellen selbst, als auch im umgebenden Netzwerk - den balancierten Umsatz von alten und neuen Neuronen drastisch beeinflusst, indem es die stabile, längerfristige Integration der neuen Neurone verhindert. Ein reduzierter funktioneller Beitrag der adult-geborenen Neurone zum Netzwerk stellt eine mögliche Ursache für die Riechstörungen in A30P α -SYN Mäusen dar.

Während in beiden Genotypen pro Zeitintervall der gleiche Anteil an Neuronen neu dazukam (~10%), wurde eine deutlich höhere Fraktion an verlorenen Nervenzellen in den A30P α -SYN Mäusen (~12%) verglichen mit dem Wildtyp (~8%) gemessen. Interessanterweise waren von dem erhöhten Zellverlust in den Parkinsonmäusen vor

allem ‚kurzlebige‘ Neurone betroffen, die zum vorangehenden Zeitpunkt erst neu integrierten. Insgesamt zeigen die Ergebnisse der *in vivo* zwei-photonen-mikroskopischen Studie, dass derselbe Anteil an Nervenzellen mit einem dopaminergen Schicksal in der glomerulären Schicht ankommt, und sich vermutlich auch vorübergehend in das Netzwerk eingliedert. Im Riechkolben der A30P α -SYN Mäuse weisen die Neurone jedoch eine deutlich geringere Lebenserwartung auf, da sie oftmals kurz nach Integration wieder absterben, was in einem verminderten Zugewinn an neuen Nervenzellen über die Zeit resultiert. Dieses erstmals kontinuierlich über die Zeit erfasste, pathologische Integrationsdefizit in den Parkinsonmäusen steht in einem starken Gegensatz zu dem parallel beschriebenen, altersabhängigen Anstieg der Anzahl dopaminerg periglomerulärer Neurone im Wildtyp (Abbildung 2.11; Adam und Mizrahi, 2011). Folglich entsteht in den A30P α -SYN Mäusen der Mangel an einer erfolgreichen Substitution von prä-existenden adult-geborenen Neuronen mit neuen funktionellen Zellen. Ein solcher regelmäßiger Austausch mit einer präzisen Balance von alten und neuen Neuronen und einer normalen Rate an Nervenzelleliminierung wurde jedoch als ein wichtiger Faktor für die Geruchsdiskriminierung identifiziert (Mouret et al., 2009). Aus der aktuellen Datenlage folgt, dass möglicherweise eine instabile Integration von adult-geborenen Neuronen und damit eine verminderte neuronale Plastizität zu den beobachteten Riechstörungen in den A30P α -SYN Mäusen (Abbildung 2.2) beiträgt.

Da der erhöhte Zelltod nicht nur die TH-positiven, dopaminergen Nervenzellen betrifft (33% Reduktion), sondern auch andere periglomeruläre Subtypen (50% Reduktion; Abbildung 2.6) und Körnerzellen (45% Reduktion; Abbildung 2.7) mit einschließt (Winner et al., 2004, 2008; Marxreiter et al., 2009; May et al., 2012), handelt es sich bei diesem A30P α -SYN-induzierten Effekt offensichtlich um ein generelles Problem von integrierenden adult-geborenen Neuronen in einem α -SYN überladenen Netzwerk. In dieser Arbeit wurde im Vergleich zu Studien mit anderen transgenen α -SYN Mäusen ein geringerer Verlust an dopaminergen adult-geborenen Neuronen nachgewiesen. So zeigen PDGF β -A53T α -SYN 70% (Winner et al., 2008), PDGF β - α -SYN 59% (Winner et al., 2004) und CaMKII-A30P α -SYN Mäuse 41% (Marxreiter et al., 2009) weniger TH/BrdU-positive Nervenzellen als Kontrollen. Diese Unterschiede in den Mausmodellen sind wahrscheinlich auf die zeitlich unterschiedliche Expression des humanen α -SYN Transgens durch spezifische Promotoren zurückzuführen. Während α -SYN unter der Kontrolle des PDGF β -Promoters bereits in Vorläuferzellen und unreifen Zellen detektiert wird (Winner et al., 2004, 2008), und deshalb bereits die Migration und Differenzierung beeinflusst, handelt es sich bei Thy1 und CaMKII um späte Promotoren, unter denen die Proteinexpression erst ab dem neuronalen Stadium (DCX-Expression sinkt ab, NeuN-Expression nimmt zu) einsetzt (Kollias et al., 1987; Kahle et al., 2000; Nuber et al., 2008;

Marxreiter et al., 2009). Die verwendete Thy1-A30P α -SYN Maus stellt daher ein geeignetes Modell zur Analyse der Integration und des Schicksals der neuen Neurone in einem α -SYN beladenen Netzwerk als ein mögliches Szenarium bei der frühen Parkinsonschen Erkrankung dar (Winner et al., 2011b).

Des Weiteren wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass der Riechkolben von 6 und 12 Monate alten Parkinsonmäusen im Vergleich zum Wildtyp durch eine erniedrigte Gesamtanzahl an dopaminergen Neuronen gekennzeichnet ist, während zwei andere Subtypen an periglomerulären Neuronen, CR- und CB-positive Zellen, nicht von der A30P α -SYN Überexpression betroffen sind (Abbildung 2.4). Wie in Wildtypmäusen beobachtet wurde, steigt die Anzahl an dopaminergen Neuronen im Riechkolben während des Alterungsprozesses kontinuierlich an, anstatt nur ausgetauscht zu werden (Adam und Mizrahi, 2011; Abbildung 2.11). Dies könnte auf eine besondere Funktion von dopaminergen Neuronen hindeuten, die in den Parkinsonmäusen verloren geht. Da das Defizit an neugeborenen dopaminergen Neuronen (33%) im Vergleich zu dem Gesamtverlust an periglomerulären Nervenzellen (50%) geringer ist, müssen auch andere Subtypen von der A30P α -SYN Überexpression betroffen sein. Neben den quantifizierten TH/CB/CR-positiven Zellen existiert eine Vielzahl an weiteren GABA/GAD-positiven Zellen in der Glomerulärzellschicht (Kosaka et al., 1998), die von der vorliegenden Analyse nicht erfasst wurden. Obwohl immer wieder neue, marker-spezifische Untergruppen an Interneuronen identifiziert werden (Kosaka und Kosaka, 2013), sind bis heute nicht alle neuronalen Subtypen im murinen Riechkolben erforscht. Die beschriebenen Auswirkungen auf die sensitiven, neu integrierenden Neurone sind durch zwei unterschiedliche Ursachen zu erklären. (i) Da die Integration und das Überleben der neuen Neurone maßgeblich von neuronalem Input und neuronaler Aktivität abhängt (Ming und Song, 2011), spielen wahrscheinlich äußerlich einwirkende Einflüsse aus dem α -SYN-beladenen Netzwerk eine Rolle. So könnte die Ablagerung von A30P α -SYN im olfaktorischen Netzwerk generell zu einer Veränderung der synaptischen Aktivität des neuronalen Systems führen. Während der Reifung und Integration, zwischen 10 und 60 Tagen nach ihrer Geburt, bilden adult-geborene Nervenzellen synaptische Verbindungen mit bereits bestehenden Zellen aus (Carlen et al., 2002; Carleton et al., 2003). Danach können die Zellen bis zu 19 Monate stabil im Netzwerk integriert bleiben (Winner et al., 2002). In dieser Arbeit wurde anhand verschiedener Messgrößen und -methoden aufgezeigt, dass der kritische Schritt zwischen früher Integration und stabiler Vernetzung der neuen Nervenzellen beeinträchtigt ist (Abbildungen 2.6-2.13; Abbildung 3.1). Dabei spielen insbesondere die synaptischen Verbindungen der Mitralzellen zu ihren synaptischen Partnern, den adult-geborenen periglomerulären Neuronen und Körnerzellen, eine wichtige Rolle (Lepousez

et al., 2013). Interessanterweise weisen trotz der großflächigen Ablagerung von A30P α -SYN in unterschiedlichen Neuronen des Riechkolbens nur Mitralzellen eine pathologische Ausprägung auf (phosphoryliertes/fibrilläres α -SYN; Abbildung 2.2; Schell et al., 2009). Hierbei ist erwähnenswert, dass die Thy1-Expression im Bulbus olfactorius in den Mitralzellen beginnt (Xue et al., 1990) und die Transgenexpression unter dem Thy1-Promoter in älteren Neuronen deutlich höher ist als in jungen Neuronen (Kollias et al., 1987). Das spezifische Vorkommen der α -SYN Pathologie in den Mitralzellen ist vermutlich durch ihre Stabilität im Netzwerk bedingt, was die schrittweise Ansammlung und Ablagerung des Proteins erlaubt. Dies ist dagegen in den dynamischen Populationen an periglomerulären Neuronen und Körnerzellen nicht möglich, da diese im Prozess der adulten Neurogenese kontinuierlich ausgetauscht werden.

(ii) Löslichere α -SYN Proteinspezies (hohe Konzentration an Monomeren, Oligomeren) können eine zellautonome, toxische Wirkung auf die adult-geborenen Neurone ausüben (Cookson und van der Brug, 2008; Vekrellis und Stefanis, 2012), die ihre Integrationsstabilität und ihr längerfristigeres Überleben im Netzwerk beeinträchtigt. Obwohl periglomeruläre Neurone und Körnerzellen kein phosphoryliertes/fibrilläres α -SYN aufweisen, gehen sie dennoch in hohem Maße verloren. Diese Zellen überexprimieren ab dem neuronalen Stadium lösliches, mutiertes Protein, das bekannterweise die Assoziation in toxische Oligomere beschleunigt (Krüger et al., 1998; Conway et al., 2000). Diese intrazelluläre Toxizität durch lösliche α -SYN Spezies könnte den neuen Neuronen besonders während der kritischen Phase der synaptischen Entwicklung und Integration schaden (Yamaguchi und Mori, 2005; Kelsch et al., 2009). Diesbezüglich ist auch zu erwähnen, dass zu hohe intrazelluläre Mengen an Protein von der Zelle ausgeschieden und von außen toxisch auf die Nervenzellen einwirken können (Vekrellis und Stefanis, 2012). Definitiv ist die Gesamtkonzentration an zellulärem α -SYN ein signifikanter Faktor, die dessen Toxizität maßgeblich beeinflusst und zur Pathologie beiträgt (Singleton et al., 2003).

Die Phosphorylierung in Mitralzellen könnte folglich auch einen Schutzmechanismus der stabilen Zelle gegen die ansteigenden Mengen an löslichen Proteinformen darstellen, wie kürzlich von Oueslati et al. (2013) postuliert wurde. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass phosphoryliertes α -SYN den autophagozytotischen Abbau von α -SYN fördert. Somit führen erhöhte Phosphorylierung zu einer Verminderung der α -SYN Spiegel und einer Hemmung von Aggregation und Toxizität. In der Tat war auch in Schnitten des Riechkolbens von A30P α -SYN Mäusen keine Reduktion der Mitralzellen erkennbar.

Da die Aktivität des Thy1-Promoters und damit die Überexpression von A30P α -SYN in den neugeborenen Neuronen erst relativ spät einsetzen (Abbildung 2.3), begrenzt sich die intrazelluläre Wirkung von A30P α -SYN auf die reifenden und integrierenden Zellen.

Dementsprechend resultiert die spezifische zellautonome Überexpression von α -SYN in Vorläuferzellen der SVZ durch retrovirale Transduktion in einer verminderten Proliferation und Migrationsgeschwindigkeit, hat jedoch keinen Einfluss auf das Überleben von neuen Nervenzellen im Riechkolben (Tani et al., 2010).

In diesem Teil wurden die pathologischen Effekte des aggregations-anfälligen A30P α -SYN auf die Stabilität und das längerfristige Überleben der adult-geborenen Neurone während ihrer kontinuierlichen Integration in das Netzwerk des Riechkolbens diskutiert. Dabei spiegelt das verwendete Mausmodell mit der relativ späten Thy1-A30P α -SYN Expression zum Teil die humane Pathologie mit Lewy Körpern in den Mitralzellen (Braak et al., 2003; Ubeda-Banon et al., 2010), Riechstörungen in einem frühen Krankheitsstadium (Doty et al., 1989; Liberini et al., 2000; Winkler et al., 2011) und einem Defizit an neuronalen Vorläuferzellen (Höglinger et al., 2004) wider. Darüber hinaus bestätigen die in dieser Arbeit dargelegten Ergebnisse die in der Literatur beschriebenen Zusammenhänge von adulter Neurogenese und feiner Geruchsdiskriminierung (Abbildung 2.2; Enwere et al., 2004; Mouret et al., 2009). Dennoch ist der zelluläre Mechanismus, der für die Riechstörung der A30P α -SYN Mäuse verantwortlich ist, noch nicht vollständig aufgeklärt. Ein kombinierter Effekt aus zell-autonomen und Netzwerk-assoziierten Mechanismen ist durchaus wahrscheinlich (Marxreiter et al., 2013). Um die beobachteten Auswirkungen der A30P α -SYN Überexpression besser zu verstehen, werden im Folgenden die Ergebnisse aus der detaillierten Analyse der dendritischen Reifung und Integration von adult-geborenen Neuronen erörtert, und insbesondere die synaptischen Verbindungen zu Mitralzellen beleuchtet. Dabei gilt zu berücksichtigen, dass die Störungen in der Geruchsdiskriminierung der Parkinsonmäuse vermutlich durch ein komplexes Zusammenspiel von verschiedenen Zelltypen verursacht werden.

3.3 Unvollständige dendritische Ausreifung und reduzierte Spineplastizität in A30P α -SYN Mäusen

Während neuropathologische Untersuchungen an Hirngewebe von Parkinsonpatienten, sowie an entsprechenden transgenen Tiermodelle, den Zusammenhang zwischen motorischen Symptomen und dem Schwund von Dendriten und einer verminderten Spinedichte in medialen Spine-tragenden Neuronen des Paleo- und Neostriums (McNeill et al., 1988; Zaja-Milatovic et al., 2005) nahelegen, liefern die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse einen ersten Hinweis auf das Vorliegen eines ähnlichen Zusammenhanges zwischen Riechfunktion und der Reifung adult-geborener Neurone im Riechkolben (Abbildung 3.2). Der Krankheitsverlauf von Morbus Parkinson beginnt

bereits mehrere Jahre vor dem Auftreten von Bewegungsstörungen unter anderem mit einer Beeinträchtigung der Riechfunktion. Deshalb könnte die Erkennung von strukturellen und funktionellen Veränderungen im Riechkolben das Verständnis der Pathobiologie der Krankheit fördern und gleichzeitig eine Frühdiagnose ermöglichen. Die selektive Ablagerung von toxischem α -SYN im Riechkolben, nicht jedoch in anderen Strukturen des Vorderhirns, während der prämotorischen Phase der Parkinsonschen Erkrankung (Braak et al., 2003; Jellinger et al., 2012), zusammen mit dem in α -SYN Mausmodellen beobachteten extensiven Verlust von adult-geborenen periglomerulären Neuronen und Körnerzellen (Marxreiter et al., 2013), machen diesen Teil des Gehirns zu einem attraktiven experimentellen Modell.

Die physiologische Funktion von α -SYN besteht unter anderem in dem Mitwirken bei der Aufstellung des präsynaptischen SNARE-Protein-Komplexes und beim Vesikelrecycling (Abbildung 1.5; Burré et al., 2010; Nemani et al. 2010). Sowohl in transgenen α -SYN Mäusen als auch Parkinsonpatienten wurde eine pathologische Verteilung der SNARE-Proteine (Darios et al., 2010; Garcia-Reitböck et al., 2010) und eine Fehlfunktion des SNARE-Komplexes beobachtet (Nakata et al., 2012). α -SYN besitzt außerdem eine bedeutende Rolle bei der regulierten SNARE-gesteuerten Membranfusion und strukturellen Plastizität (Abbildung 1.5; Burré et al., 2010; Rizo und Südhof, 2012). In A30P α -SYN Mäusen deutet das verminderte Auswachsen der Dendritenbäume von neuen periglomerulären Neuronen und Körnerzellen (Abbildungen 2.8 und 2.9) und ihr Spineverlust (Abbildungen 2.12 und 2.13) auf Störungen dieser wichtigen SNARE-assoziierten Mechanismen hin. Die apikalen Dendriten sind dabei die am stärksten dynamischen und damit funktionell anspruchsvollsten Kompartimente von adult-geborenen Körnerzellen. Sie sind durch ständige Membranerweiterung und kontinuierlichen Umsatz maßgeblich gekennzeichnet, Vorgänge in die ebenfalls dendritische SNARE-Proteine verwickelt sind (Ovsepian und Dolly, 2011). Aufgrund von seiner zusätzlichen Faltfunktion zur Polymerisierung von Mikrotubuli-assoziiertem Protein (MAP) und seiner regulierenden Wirkung auf die Aktindynamik (Sousa et al., 2009) hat α -SYN definitiv einen störenden Einfluss auf die Spinestabilität, die aktivitätsabhängige dendritische Plastizität und das Dendritenwachstum (Yuste und Denk, 1995; Bhatt et al., 2009; Tsaneva-Atanasova et al., 2009; Winner et al., 2012). Deshalb erscheint es sehr wahrscheinlich, dass die Überexpression von A30P α -SYN während der kritischen Phase der neuronalen Entwicklung und Synapsenbildung in neugeborenen Zellen (Kelsch et al., 2009) das Wachstum der feinen Nervenzellfortsätze beeinträchtigt, welche die erfolgreiche Integration in das bestehende Netzwerk erst ermöglichen. Daraufhin sterben die unvollständig entwickelten und labil integrierten Neurone folglich ab. Des Weiteren könnte eine fehlerhafte Signalwirkung von Notch,

3 Diskussion

induziert durch die Überexpression von humanem α -SYN, zu der verminderten dendritischen Ausreifung der integrierenden Neurone (Crews et al., 2008) beitragen. Diese Hypothese wird maßgeblich durch die Rolle von Notch-Signalen bei der dendritischen Verzweigung bekräftigt (Breunig et al., 2007).

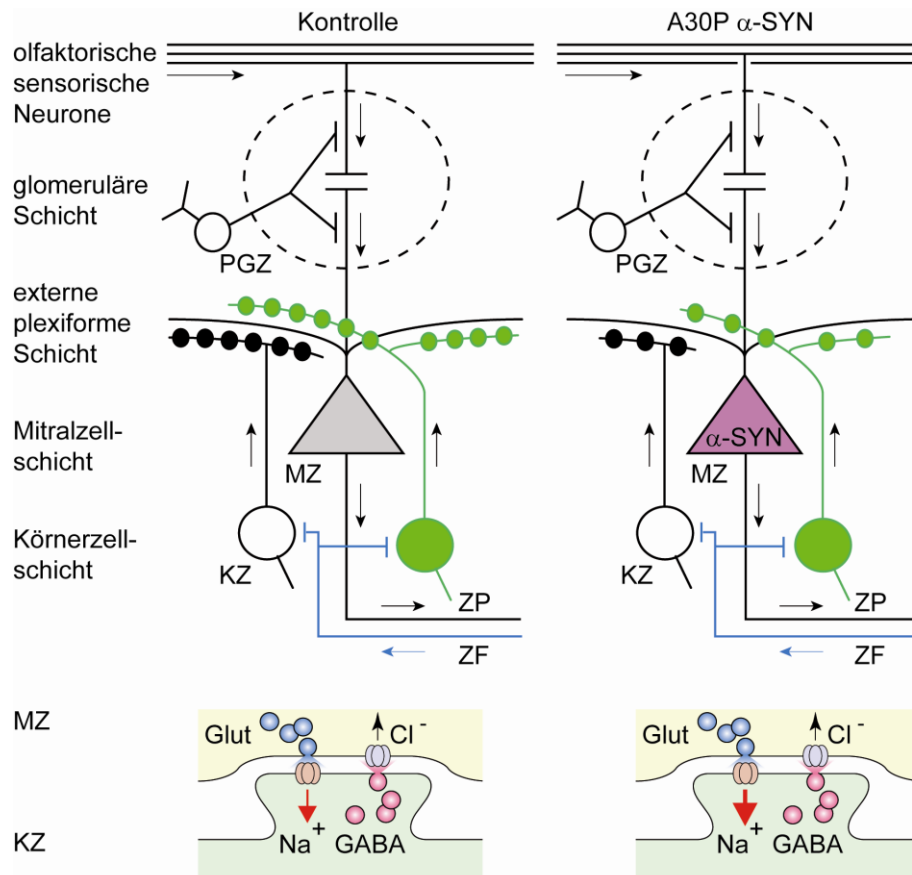


Abbildung 3.2: Morphologische und funktionelle Ursachen für die verminderte Integration von adult-geborenen Neuronen in A30P α -SYN Mäusen. Schematische Darstellung des murinen Riechkolbens mit seinen Verbindungen in Wildtyp (links) und A30P α -SYN Mäusen (rechts). Die transgene Überexpression von humanem A30P α -SYN unter der Kontrolle des neuronalen Thy1-Promotors resultiert in der Ablagerung von phosphoryliertem α -SYN (magenta) in Mitralzellen (MZ; grau). Die lateralen Dendriten der MZ bilden dendrodendritische Synapsen mit den Spines von adult-geborenen Körnerzellen (KZ, grün), die aufgrund der kontinuierlichen Integration von neuen KZ in das bestehende Netzwerk eine äußerst hohe strukturelle Plastizität aufweisen. In dieser reziproken Synapse führt Glutamanregung (blau; unten) durch die MZ zur Ausschüttung von GABA (pink) aus dem Körnerzellspine und der unmittelbaren Feedback-Hemmung der MZ bzw. lateralen Hemmung von benachbarten KZ. Dies ist ein essentieller Mechanismus, der für die Feinabstimmung von Geruchsignalen und Geruchsdiskriminierung verantwortlich ist. Neu integrierende KZ besitzen eine unvollständig ausgereifte dendritische Architektur (kürzere, weniger verzweigte apikale Dendriten, verminderte Membrankapazität, erhöhter Eingangswiderstand) und einen erhöhten Spineverlust durch mangelnde Spinestabilität. Darüber hinaus sind die erregenden postsynaptischen Miniaturströme der neuen KZ in den Parkinsonmäusen durch eine verminderte Frequenz bei gleichzeitig erhöhter Amplitude gekennzeichnet (roter Pfeil). Diese morphologischen und funktionellen Ergebnisse liefern Hinweise darauf, dass A30P α -SYN störend auf die dendrodendritischen Synapsen zwischen MZ und adult-geborenen KZ einwirkt und die funktionelle synaptische Integration der KZ verhindert. Diese beschriebenen pathologischen Vorgänge führen zu einem reduzierten Überleben der neuen Neurone, und tragen möglicherweise zu den Riechstörungen im frühen Krankheitsverlauf des Morbus Parkinson bei. PGZ=periglomeruläre Zelle; ZP=Zentripetalfasern; ZF=Zentrifugalfasern.

Die in dieser Arbeit erstmals beschriebene 22,7%ige Reduktion der Spinedichte in adult-geborenen Körnerzellen von A30P α -SYN Mäusen (Abbildung 2.12), die mit über 95% die Mehrheit der Interneurone des Riechkolbens darstellen, ist mit Ergebnissen aus anderen Gehirnregionen vergleichbar. Nervenzellen des Striatums zeigen sowohl in Tiermodellen als auch in Parkinsonpatienten einen Spineverlust von 30-50%, der sich in komplexen anatomischen, neurochemischen und elektrophysiologischen Veränderungen der glutamatergen Signalübertragung äußert (Zaja-Milatovic et al., 2005; Villalba und Smith, 2010). Der erste eindeutige Beweis für ein Defizit in der striatalen Spinedichte wurde in chemischen Parkinsonmodellen erbracht. So zeigten sowohl 6-Hydroxydopamin (6-OHDA) behandelte Ratten als auch 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP)-behandelte Affen einen 20%igen Spineverlust im Striatum (Ingham et al., 1989; Villalba et al., 2009). In Parkinsonpatienten korrelierte der Grad des Spineverlustes mit dem Level an dopaminergem Denervierung des Striatums (Zaja-Milatovic et al., 2005). Ein solcher Zusammenhang könnte auch im Riechkolben von Bedeutung sein, da der Spineverlust in 6 Monate alten A30P α -SYN Mäusen (Abbildung 2.12) ebenfalls mit einem 30%igen Verlust an dopaminergen Interneuronen einhergeht (Abbildung 2.6). Zudem bestätigt eine Studie über adult-geborene Körnerzellen im Gyrus dentatus (Winner et al., 2012) den beobachteten negativen Einfluss der α -SYN Überexpression auf die Entwicklung von Dendriten und Spines adult-geborener Neuronen im Riechkolben (Abbildungen 2.8, 2.9, 2.12). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus dieser Arbeit wurden im Gyrus dentatus eine verminderte Komplexität dendritischer Bäume und eine veränderte Spineplastizität beobachtet.

Bei der Interpretation dieser Daten muss berücksichtigt werden, dass die physiologische Funktion von α -SYN noch nicht vollständig aufgeklärt ist (Bendor et al., 2013). In α -SYN KO Mäusen wurde lediglich von einer milden Reduktion der Dopaminspeicher im Striatum berichtet, die auf eine leicht erhöhte Dopaminausschüttung zurückzuführen ist (Abeliovich et al., 2000). In Übereinstimmung mit anderen Studien, die in α -SYN KO Mäusen keinen Phänotyp zeigen konnten (Specht und Schöpfer, 2001), wurde in dieser Arbeit kein signifikanter Effekt des Fehlens von α -SYN auf die Reifung und das Überleben adult-geborener Neurone beobachtet. Das Fehlen eines Phänotyps im Riechkolben der α -SYN KO-Mäuse könnte durch kompensatorische Mechanismen während der Entwicklung erklären werden, beispielsweise durch eine Hochregulation von anderen Mitgliedern der SYN Familie mit ähnlichen Funktionen (Chandra et al., 2004). Im Gegensatz zu dem einfachen α -SYN KO weisen dreifache α -/ β -/ γ -SYN KO Mäuse einen eindeutigen Phänotyp mit einer verkürzten Überlebensspanne, verminderter Synapsengröße und retinaler Fehlfunktion auf (Greten-Harrison et al., 2010).

3.4 Auswirkungen auf die synaptische Physiologie und die Kodierung von olfaktorischen Inputs

Die sensorische Verarbeitung im Bulbus olfactorius hängt maßgeblich von der reziproken dendrodendritischen Synapse ab, die eine Mitral-/Tufted-Zell-an-Körnerzell-Erregung und Körnerzell-an-Mitral-/Tufted-Zell-Hemmung vermittelt (Abbildung 3.2; Shepherd et al., 2007). Werden Mitral-/Tufted-Zellen durch sensorische Signale aktiviert, führt diese Erregung über einen direkten Rückkopplungsmechanismus zu ihrer anschließenden Selbsthemmung sowie lateralen Hemmung ihrer Nachbarzellen. Folglich unterliegen sowohl die Rate als auch das Muster des Ausgangssignales von Mitral-/Tufted-Zellen auf ihre weiter entfernten subkortikalen und kortikalen Ziele einer kontinuierlichen Feinabstimmung durch die Körnerzellen (Lepousez et al., 2013). Eine solche spezielle synaptische Anordnung stellt eine wichtige Ausstattung der Neurone für eine akkurate zeitliche Verschlüsselung von olfaktorischen Eingangssignalen und einer präzise Geruchsdiskriminierung dar (Enwere et al., 2004; Mandairon et al., 2006; Mouret et al., 2009).

Im Hinblick auf die synaptische Integration und die dadurch erzeugten zeitabhängigen Ausgangssignale der adult-geborenen Neurone bewirken die veränderten passiven Eigenschaften ihrer Membranen sehr wahrscheinlich eine Veränderung ihrer Integrationseigenschaften. Aufgrund des erhöhten Eingangswiderstandes und der verminderten Membrankapazität durch die unvollständig entwickelten Dendriten der Neurone kommt es zu einem schlechten Signal-zu-Rausch-Verhältnis. So würde ein starkes synaptisches Rauschen eine wahllose Hemmung hervorrufen und störend auf das Ausgangssignal von Mitral-/Tufted-Zellen einwirken (Häusser und Clark, 1997).

Die verminderten Dendritenlängen ermöglichen ein verbessertes Space-Clamping (Armstrong und Gilly, 1992), das die größeren Amplituden der sEPSCs in den Körnerzellen der A30P α -SYN Mäuse zu einem gewissen Grad erklären würde. Dennoch können Veränderungen in der Expression und Sensitivität von AMPA-Rezeptoren nicht ausgeschlossen werden (Abbildung 2.15; Hüls et al., 2011). Korrespondierend wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass Parkinson- und Wildtypmäuse zwar insgesamt die gleiche Dichte an GluR1-positiven AMPA-Rezeptoren auf ihren Körnerzellendendriten besitzen, Parkinsonmäuse jedoch eine um 22,7% reduzierte Spinedichte aufweisen, auf denen AMPA-Rezeptoren größtenteils lokalisiert sind (Abbildung 2.15). Dieser Befund könnte auf Folgendes hindeuten: (i) AMPA-Rezeptoren sitzen dichter angeordnet auf den adult-geborenen Körnerzellspines der A30P α -SYN Mäuse, und/oder (ii) AMPA-Rezeptoren sind essentiell für das Überleben der Spines. Eine dichtere Anordnung an AMPA-Rezeptoren auf dendritischen Spines würde auf einen vergrößerten Spinekopf schließen lassen. Interessanterweise zeigte die Analyse der Spinekopfbreite auf adult-

geborenen Körnerzelldendriten einen klaren Trend in Richtung höherer Werte in A30P α -SYN Mäusen, der jedoch nicht signifikant war (Abbildung 2.14c). Die drei Morphologieklassen waren in beiden Genotypen etwa gleich verteilt (Abbildung 2.14b). Da die Spinestruktur nur zu einem Zeitpunkt mittels *in vivo* Zwei-Photonen-Mikroskopie untersucht wurde, ist es schwer, präzise Aussagen über Größenunterschiede zu treffen. Um solche sehr feinen Differenzen in der Spinegröße zu detektieren, ist diese Analysenmethode eventuell zu ungenau.

Eine höhere AMPA-Rezeptordichte auf den Körnerzellspines von A30P α -SYN Mäusen lässt Rückschlüsse auf eine erhöhte Aktivität der Mitral-/Tufted-Zellen in den A30P α -SYN überexprimierenden Mäuse ziehen (Abbildung 3.2). Zusätzlich sprechen die stärkeren Effekte von TTX auf die adult-geborenen Körnerzellen der A30P α -SYN Mäuse für eine erhöhte Aktivität von Mitral-/Tufted-Zellen und/oder eine gesteigerte Empfindlichkeit der Körnerzellen auf erregende Eingangssignale.

Einen weiteren Befund dieser Arbeit stellt die ungleichmäßige Verteilung von prä- und postsynaptischen Proteinen auf den adult-geborenen Körnerzelldendriten der A30P α -SYN Mäuse dar (Abbildung 2.15). Die erniedrigte Dichte an VGAT-Clustern bei unveränderter Dichte an Gephyrin-Clustern deutet auf eine gesteigerte Empfindlichkeit von präsynaptischen gegenüber postsynaptischen Komponenten auf die A30P α -SYN Überexpression hin. Verschiedene Studien zur synaptischen Funktion haben gezeigt, dass die degenerativen Prozesse beim Morbus Parkinson aus einem Mangel an Neurotransmitter an der Präsynapse resultieren (Kramer und Schulz-Schaeffer, 2007; Nikolaus et al., 2009). Weiter wurde belegt, dass erhöhte Mengen an α -SYN die Transmitterfreisetzung hemmen, indem sie die Größe des Pools an synaptischen Vesikeln reduzieren (Nemani et al., 2010). Ein ähnliches Szenario ist auch zur Erklärung der bei A30P α -SYN Mäusen erhobenen Befunde denkbar. So liefert die Dichte an VGAT-Clustern auf den Dendriten der neugeborenen Körnerzellen eine direkte Aussage zum vesikulären Transport von GABA zur dendrodendritischen Synapse. Eine verminderte Beförderung von GABA zum Wirkort könnte direkt die Neubildung und Stabilität der dendritischen Spines in den A30P α -SYN Mäusen beeinträchtigen. Weiter könnte dieses Ungleichgewicht an prä- und postsynaptischen Proteinen auch die erhöhte Empfindlichkeit der adult-geborenen Körnerzellen in den Parkinsonmäusen beeinflussen.

3.5 Therapieeffekte einer Behandlung mit der anti-aggregativen Substanz Anle138b

Junge Mäuse wurden für einen Zeitraum von 4 Monaten mit der anti-aggregativen Substanz Anle138b behandelt, um den beschriebenen Auswirkungen der A30P α -SYN Überexpression auf die adult-geborenen Neuronen entgegenzuwirken (Abbildung 2.18a). Im Speziellen sollte Anle138b durch die Verminderung der Ausbildung toxischer α -SYN Aggregate den in 6 Monate alten A30P α -SYN Mäusen beobachteten Verlust von dendritischen Spines und Neuronen verhindern. Dieser therapeutische Ansatz zeigte jedoch keine Wirkung auf die Spinedichte von adult-geborenen Körnerzeldendriten (Abbildung 2.18c,e) oder auf das Überleben neuer dopaminerger periglomerulärer Neurone (Abbildung 2.18 b,d).

Dieser Befund schließt nicht aus, dass mittels Anle138b eine gewisse Hemmung der durch A30P α -SYN Überexpression induzierten Proteinaggregation im Riechkolben möglich war. Dieser geringe Effekt war allerdings nicht messbar. Wahrscheinlich tragen lösliche, synaptotoxische α -SYN Oligomere (Brown, 2010), die bis heute leider nur unzureichend mit immunohistochemischen Methoden detektiert werden können (Fagerqvist et al., 2013), zu den pathologischen Veränderungen der adult-geborenen Neuronen und ihren Synapsen bei. Eine weitere toxische Ursache stellt die stark erhöhte Konzentration an mutierten humanen Proteinmonomeren dar, welche die physiologischen α -SYN Spiegel um mehr als das Doppelte übersteigt (Kahle et al., 2000) und von Anle138b nicht beeinflusst wird. In der Tat wurde die Duplikation bzw. Triplikation des α -SYN Gens mit einhergehender erhöhter Proteinexpression als ursächlich für familiäre Formen des Morbus Parkinson beschrieben (Singleton et al., 2003). Da dendritische Spines äußerst sensitive Strukturen im Gehirn darstellen, die sensibel auf unterschiedlichste Einflüsse reagieren, beispielsweise auf das A β -Peptid (Selkoe, 2008) oder Hormone (Luine und Frankfurt, 2013), ist es nicht überraschend, dass bereits erhöhte Mengen von aggregations-anfälligem A30P α -SYN zu Veränderungen der Spineplastizität führen können. So zeigten bereits 3 Monate alte Parkinsonmäuse ohne Mitralzellpathologie eine um 7,5% reduzierte Spinedichte im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 2.12). Im Gyrus dentatus von jungen Mäusen, die humanes α -SYN unter dem PDGF β -Promoter überexprimierten, weisen adult-geborene Körnerzellen dagegen eine erhöhte Spinedichte, die als Kompensationsmechanismus auf die veränderte Umwelt erklärt wird (Winner et al., 2012). Die zellspezifische virale Überexpression von humanem α -SYN in neugeborenen Zellen von Wildtypmäusen resultierte dagegen in einer signifikanten Erniedrigung der dendritischen Spinedichte. Folglich reagieren die neuen Zellen sowohl auf einen zielgerichteten intrazellulären Proteinanstieg als auch auf eine großflächige Überexpression von α -SYN im Netzwerk

mit einer Veränderung der Spineplastizität. Als gemeinsames Ergebnis aller Studien mit einer α -SYN Überexpression war eine erniedrigte Überlebensrate der neuen Neurone zu verzeichnen, die in der vorliegenden Arbeit erstmals auf eine gestörte synaptische Integration der neuen Nervenzellen zurückgeführt werden konnte (Abbildungen 2.6-2.17). Dabei wirken sich vermutlich sowohl eine Zunahme der intrazellulären A30P α -SYN Konzentration als auch erhöhte Proteinmengen im Netzwerk, insbesondere aggregiertes, phosphoryliertes Protein in den Mitralzellen, schädlich auf die Integration aus, zwei mögliche Quellen, die anhand der Daten aus der Therapiestudie nicht klar voneinander abzugrenzen sind.

Der Befund, dass bereits bei 3 Monate alten Mäusen ein leichter Rückgang der Spinedichte zu verzeichnen war, der sich im Alter von 6 Monaten noch verstärkte (vergleiche Abschnitt 2.6.1), legt nahe, dass die beobachteten Veränderungen an adult-geborenen Neuronen im Riechkolben ein Frühsymptom der Krankheit kennzeichnen. Dabei stellt die Anzahl dendritischer Spines definitiv eine äußerst empfindliche und möglicherweise diagnostisch wichtige Messgröße dar. Zumal 3-6 Monate alte A30P α -SYN Mäuse nur geringe Mengen an pathologischen Proteinablagerungen aufweisen, reicht offensichtlich bereits eine geringe Menge phosphoryliertem/fibrillärem α -SYN aus, um die Integration von adult geborenen Neuronen zu beeinflussen. Dieser Befund steht im Einklang mit der neuropathologischen Beobachtung einer frühen Beteiligung des Riechkolbens beim Morbus Parkinson. Ein möglicherweise toxischer Effekt von erhöhten Proteinmonomermengen bei einem verhältnismäßig geringen Anteil an aggregiertem α -SYN könnte den unzureichenden Therapieeffekt von anti-aggregativem Anle138b zum Teil erklären. Der frühe Beginn der Therapiestudie diente dazu, dem Spineverlust bereits in einem frühen Krankheitsstadium therapeutisch entgegenzuwirken. Unklar bleibt jedoch noch, in wieweit Anle138b wirklich auf die Proteinaggregation in Mitralzellen einwirkt.

In der Studie von Winner et al. (2012) konnten die durch α -SYN Überexpression induzierten Veränderungen der Spinedichte und der Verlust von adult-geborenen Neuronen im Gyrus dentatus mittels Rolipram partiell hemmen. Rolipram ist ein selektiver cAMP-spezifischer Phosphodiesterase-4 Inhibitor, der eine Erhöhung von cAMP und folglich eine gesteigerte Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB (*cAMP response element binding protein*) bewirkt (MacKenzie und Houslay, 2000). Die CREB-abhängige Signalwirkung kontrolliert essentielle Wachstumsschritte der adulten Neurogenese, wie beispielsweise das Überleben, die Reifung und die Integration von neuen Neuronen (Merz et al., 2011). Dies stellt einen möglichen alternativen Weg zur Therapie von A30P α -SYN vermittelten Reifungs- und Integrationsdefiziten von adult-geborenen Nervenzellen im Riechkolben dar.

3.6 Zusammenhänge zwischen den pathologischen Veränderungen in der Reifung und Integration adult-geborener Neurone und den Riechstörungen

Tragen adult-geborene Neurone zur Riechfunktion bei? Können die Störungen in der Geruchsdiskriminierung der A30P α -SYN Mäuse durch die Veränderungen der adult-geborenen Nervenzellen erklärt werden?

Der Zusammenhang zwischen der Riechleistung und adulter Neurogenese wurde in einer Vielzahl an Studien nachgewiesen (Lazarini und Lledo, 2011), wobei insbesondere die synaptische Integration und das Überleben von neuen Zellen von extrinsischen Modulatoren kritisch beeinflusst wird. Während beispielsweise die Anreicherung der Umgebung mit Geruchsstoffen zu einer Erhöhung der Proliferation (Alonso et al., 2008) und einem gesteigerten Überleben von adult-geborenen Körnerzellen führt (Rochefort et al., 2002), wird ihr Bestehen im Netzwerk durch Geruchsentzug vermindert (Mandairon et al., 2006; Bovetti et al., 2009). Geruchsdiskriminierung, Lernen und Gedächtnis (Alonso et al., 2012; Sultan et al., 2012) hängen von dem synaptischen Zusammenspiel zwischen Interneuronen und Mitral-/Tufted Zellen ab (Yokoi et al., 1995; Laurent, 2002; Lledo und Lagier, 2006), wobei die lokale synaptische Hemmung durch die Interneurone für die Geruchsdiskriminierung (Abraham et al. 2010) und die Geruchswahrnehmung (Mandairon et al., 2006) wichtig ist. Dadurch ist eine akkurate zeitliche Verschlüsselung von olfaktorischen Eingangssignalen und die präzise Feinabstimmung und Unterscheidung von Gerüchen möglich. Aufgrund der verminderten apikalen Dendritenlänge und -verzweigungen (Abbildungen 2.8 und 2.9) von adult-geborenen Körnerzellen mit der reduzierten Spine Stabilität und Spine Dichte (Abbildungen 2.12 und 2.13) können in den A30P α -SYN Mäusen proportional weniger dendrodendritische Synapsen mit Mitralzellen ausgebildet werden, was folglich zu einer verminderten Signalhemmung und schließlich in einer mangelhaften Auftrennung einzelner Gerüche resultiert. Interessanterweise zeigen adult-geborene Neurone nach Geruchsentzug eine verminderte Dichte an distalen, dendrodendritischen Outputsynapsen (Kelsch et al., 2009), ein Ergebnis das zu den Beobachtungen in A30P α -SYN Mäusen passt, die durch eine Störung der feinen Geruchsdiskriminierung gekennzeichnet sind (Abbildung 2.2).

Wegen dem hohen Verlust von 45-50% adult-geborener Nervenzellen in den Parkinsonmäusen (Abbildungen 2.6 und 2.7) ist das Netz an GABAergen Interneuronen weniger dicht gepackt, wodurch überhaupt eine verringerte Anzahl an synaptischen Partnern vorhanden ist. In Übereinstimmung mit anderen Studien (Winner et al., 2004, 2008; Nuber et al., 2008; Marxreiter et al., 2009; May et al., 2012) wurde am Beispiel der dopaminergen Neurone nachgewiesen, dass die Ansammlung und Ablagerung von schädlichem α -SYN im Netzwerk des Riechkolbens zu einer unvollständigen und instabilen Integration der adult-geborenen Nervenzellen und ihrem verfrühten Untergang

führt (Abbildungen 3.1 und 3.2). Ein direkter Einfluss des α -SYN-bedingten, verminderten Überlebens von adult-geborenen Nervenzellen auf die Riechfunktion (Fleming et al., 2008) ist sehr wahrscheinlich, da eine präzise Balance zwischen neuen und reifen Interneuronen durch eine normale Rate an Nervenzelleliminierung die Grundvoraussetzung für eine optimale Geruchserkundung und -diskriminierung darstellt (Mouret et al., 2009).

Welche Rolle im Speziellen der Untergang von dopaminergen Neuronen für die Riechfunktion spielt, kann anhand der Daten nicht festgelegt werden. In Parkinsonpatienten wird trotz des reduzierten Riechkolbenvolumens (Brodoehl et al. 2012) von einer erhöhten Anzahl an dopaminergen Nervenzellen in dieser Gehirnregion berichtet, die durch einen kompensatorischen Mechanismus auf die frühe Degeneration von anderen Neurotransmittersystemen erklärt wird (Huisman et al., 2004; Mundinano et al., 2011). An beiden Studien ist jedoch ihre geringe Anzahl an Parkinsonfällen (6-10) zu kritisieren. Zusätzlich ist es aufgrund der problematischen Konservierung von humanem postmortalen Gewebe, der variablen postmortem Zeit, des antigenmaskierenden Effektes bei der Gewebefixierung, und der limitierten Spezifität von Antikörpern für Humangewebe äußerst schwierig, Aussagen über die adulte Neurogenese im Parkinsonpatienten zu treffen (Marxreiter et al., 2013).

In dem verwendeten Parkinsonmausmodell waren neben dopaminergen Neuronen auch andere periglomeruläre Untergruppen und Körnerzellen von der Toxizität durch A30P α -SYN Überexpression betroffen, was für die Bedeutung eines generellen Mangels an adult-geborenen Interneuronen für die Riechfunktion der Parkinsonmäuse spricht. Dabei hängt vermutlich die Integrationsrate und der Integrationserfolg vom Grad der sensorischen Aktivität ab, da verschiedene Populationen von adult-geborenen periglomerulären Nervenzellen unterschiedlich stark auf eine Geruchsdepression reagieren (Bovetti et al., 2009). Beispielsweise wurde gezeigt, dass Veränderungen im dopaminergen System, speziell in der Bindung von Dopamintransportern, zu Riechstörungen in Mäusen (Tillerson et al., 2006) und älteren Menschen (Larsson et al., 2009) führen. Darüber hinaus wurden Störungen in der feinen Geruchsdiskriminierung bei alten Mäusen mit einer Reduktion der epidermalen Wachstumsfaktor (EGF)-bedingten adulten Neurogenese assoziiert (Enwere et al., 2004). Interessanterweise wurde in Parkinsonpatienten eine verminderte Anzahl an EGF-positiven Zellen in der SVZ beobachtet (O'Keeffe et al., 2009). Zusätzlich wurden reduzierte EGF-Spiegel im Zusammenhang mit erniedrigten TH-Spiegeln im Striatum/präfrontalen Kortex und einer dopaminergen Neurodegeneration im Mittelhirn beschrieben (Iwakura et al., 2005). 6-OHDA und MPTP-injizierte Mäuse mit starkem dopaminergen Nervenzellverlust in der Substantia nigra zeigten ebenfalls eine verminderte Proliferation in der SVZ, ein

vermindertes Überleben von neugeborenen Körnerzellen und eine erhöhte Anzahl dopaminerger periglomerulärer Neurone (Höglinger et al., 2004), Effekte die nach EGF-Applikation reversibel waren (O'Keeffe et al. 2009b). Die anatomische Grundlage für den dopaminergen Input aus dem Mittelhirn in die SVZ ist jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt, wobei ein kleiner Teil der dopaminergen Neurone zwischen Substantia nigra und Area tegmentalis ventralis spezifisch in die SVZ projizieren soll (Lenington et al., 2011). Diese akuten Läsionsmodelle induzieren jedoch ein schnelles und starkes Neurotransmitterdefizit und spiegeln deshalb nicht den typischerweise langsam fortschreitenden neurodegenerativen Prozess des Morbus Parkinson wieder, der mit der Aggregation von α -SYN assoziiert wird.

Anhand der Daten aus dieser Arbeit können zwei Wirkungsbezüge für die Riechstörungen festgelegt werden: (i) die A30P α -SYN Pathologie führt zu den morphologischen Veränderungen der adult-geborenen Neurone und den resultierenden verminderten integrativen Eigenschaften. Der daraus folgende Verlust/Mangel an neuen Zellen hat wiederum Störungen in der Geruchsdiskriminierung zur Folge. (ii) Alternativ könnte die A30P α -SYN Pathologie über unbekannte biologische Mechanismen unmittelbar in einer verminderten Riechleistung resultieren. Die durch die Riechstörung verminderten olfaktorischen Eingangssignale würden sich ähnlich wie bei einem Geruchsentzug in einer reduzierten Anzahl an adult-geborenen Neuronen äußern. Ferner könnten Untersuchungen im murinen Riechkolben mit reversibler Toxinexpression in neugeborenen Neuronen mittels DCX-Promotor, ähnlich wie in der aktuellen Studie von Vucovic et al. (2013), durchgeführt werden, um die funktionelle Bedeutung der adult-geborenen Nervenzellen besser zu beschreiben. Dieses System erlaubt das spezifische Ausschalten von unreifen DCX-exprimierenden Neuronen durch terminogene Gabe von Diphtherietoxin, während der bestehende Pool an Interneuronen intakt bleibt. Im Hippocampus wurde auf diese Weise gezeigt, dass unreife, DCX-exprimierende Neurone für das räumliche Lernen, nicht jedoch für das Abrufen gespeicherter Langzeiterinnerungen, wichtig sind.

Insgesamt stellt die in dieser Arbeit vorgestellte Methode der zeitlich terminierten Markierung und detaillierten *in vivo* Untersuchung von Interneuronen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien ein geeignetes Modell zur Aufklärung des Beitrages der neuen Zellen zur sensorischen Verarbeitung und ihrer physiologischen und pathophysiologischen Anpassung dar. Die hier gewonnenen Erkenntnisse sind wichtig, um eine Basis für die Entwicklung von neuen Therapien zur Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen, wie dem Morbus Parkinson, zu schaffen. In Zukunft müsste im Speziellen aufgeklärt werden, ob sich eine therapeutische Stimulation der Reifung und Integration adult-geborener Neurone im Riechkolben positiv auf die

verminderte Geruchsdiskriminierung in Parkinsonpatienten (Winkler et al., 2011) auswirken würde.

3.7 Schlussfolgerungen für die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen

Die adulte Neurogenese ist ein Phänomen, das man bei den meisten Wirbeltieren und wirbellosen Tieren, wie den Krebstieren, Fischen, Reptilien, Vögeln und Säugetieren, sowie dem Menschen beobachtet hat (Brus et al., 2013). Obwohl sie evolutionär recht gut konserviert ist, gibt es einige wichtige Unterschiede zwischen den Spezies, wie zum Beispiel die zelluläre Zusammensetzung und morphologische Architektur in der SVZ, sowie die dynamische Reifung der neugeborenen Nervenzellen. Letztere weist in Mäusen, jedoch nicht in Schafen, deutliche Unterschiede zum Menschen auf. Insgesamt ist die adulte Neurogenese im humanen Riechkolben immer noch relativ unerforscht. Da die Anzahl an migrierenden Neuroblasten zwar in der Kindheit hoch ist, jedoch mit steigendem Alter drastisch absinkt (Sanai et al., 2011), ist das Fortdauern der adulten Neurogenese in der SVZ und ihr Vorkommen im RMS und Riechkolben bis heute umstritten (Wang et al., 2011; Bergmann und Frisen, 2013). Während einige Studien das Vorkommen von neuen Nervenzellen im adulten Bulbus olfactorius mit Markern wie Ki-67, DCX, NeuroD, Nestin und durch Kolo-kalisation mit den GABAergen neuronalen Markern TH, CR und Parvalbumin (PV), nachweisen konnten (Pagano et al., 2000; Bedard und Parent, 2004), und die Präsenz von funktionellen Genen zur Neuronenentwicklung belegt wurde (Lötsch et al., 2013), zweifeln andere das Vorkommen der Neurogenese im adulten humanen Riechkolben an (Wang et al., 2011; Bergmann et al., 2012). Bei einer Analyse des Alters der Nervenzellen des Bulbus olfactorius durch Messung der Spiegel aus Nuklearbombentests stammendem ^{14}C in genomischer DNA wurden nur ^{14}C Konzentrationen identifiziert, die mit dem Geburtsalter der Probanden übereinstimmen. Dies lässt auf eine sehr limitierte postnatale Neurogenese im menschlichen Riechkolben schließen (Bergmann et al., 2012). Als starker Kritikpunkt dieser Studie muss jedoch angemerkt werden, dass Gehirne von Patienten mit psychischen Erkrankungen untersucht wurden, die starke Medikamente eingenommen hatten. Psychische Störungen, wie beispielsweise Depressionen, haben nachweislich einen negativen Einfluss auf die adulte Neurogenese im Riechkolben (Eisch und Petrik, 2012).

Das Spektrum an nicht-motorischen Parkinsonsymptomen beinhaltet Riechstörungen (Doty et al., 1989), Depressionen und Angstgefühle (Adler, 2011; Starkstein et al., 2012), die bis zu 20 Jahre vor den Bewegungsstörungen auftreten und teilweise mit der Verarbeitung von Geruchsstoffen im Bulbus olfactorius (Doty, 2012), insbesondere der

Geruchsdiskriminierung (Winkler et al., 2011) und der Funktion des Hippocampus (Kheirbek et al., 2012; Eisch und Petrik, 2012), zusammenhängen. Da diese beiden Gehirnregionen die einzigen Nischen sind, in die neue Nervenzellen einwandern (Eriksson et al., 1998; Curtis et al., 2007), und zusätzlich die charakteristische Lewy Pathologie in frühen Parkinsonstadien im Riechkolben, nicht jedoch in archi- und paleokortikalen Regionen (Braak et al., 2003) vorhanden ist, stellt sich die berechnete Frage, ob Störungen in der adulten Neurogenese eine mögliche Ursache für die nicht-motorischen Symptome bei Parkinson sind. Zudem repräsentiert die adulte Neurogenese den einzigen endogenen neuronalen Erneuerungsmechanismus, der eine vermeintliche Wiederherstellung der neuronalen Funktion möglich macht, wodurch die Erforschung der neurogenen Prozesse bei Parkinson große Bedeutung gewinnt. Darüber hinaus stellen die Prozesse der Proliferation, Migration und Integration der neuen Neurone ein ideales Modellsystem für die Untersuchung von zellulären und neurogenen Veränderungen, die möglicherweise zu einem besseren Verständnis der initialen, pathogenen Abläufe beim Morbus Parkinson führen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit mit A30P α -SYN Mäusen zeigen in Kombination mit Studien aus anderen Tiermodellen und postmortal entnommenem Gewebe aus Parkinsonpatienten deutliche Veränderungen in der Proliferation (Höglinger et al., 2004; Lelan et al., 2011; Kohl et al., 2012), Migration (Tobias et al., 2009; Tani et al., 2010), Differenzierung (Winner et al., 2004, 2008), Integration (Marxreiter et al., 2009) und dem Überleben (Winner et al., 2004, 2008; Nuber et al., 2008; Marxreiter et al., 2009; May et al., 2012) von neugeborenen Nervenzellen der beiden Gehirnregionen der adulten Neurogenese. Obwohl die genauen zellulären Mechanismen hinter diesen Veränderungen noch nicht vollständig verstanden sind (Marxreiter et al., 2013), tragen die Ergebnisse dieser Arbeit mit der umfassenden morphologischen und funktionellen Charakterisierung der adult-geborenen Neurone des Riechkolbens maßgeblich zu einem besseren Verständnis der Riechstörungen bei Parkinson bei.

Die Verwendung von transgenen Mausmodellen ist eine Standardmethode zur Erforschung von neurodegenerativen Erkrankungen. Um einen krankheitsähnlichen Phänotyp in den Mäusen hervorzurufen, werden krankheitsassoziierte Proteine überexprimiert (LaFerla und Green, 2012; Bezard et al., 2013). Dies erscheint auf der einen Seite ein sehr artifizielles Vorgehen, auf der anderen Seite durchaus gerechtfertigt, da eine Zunahme der Proteinexpression ein charakteristisches Merkmal von Krankheiten, wie Alzheimer und Parkinson darstellt. In der Tat sind einige familiäre Formen des Morbus Parkinson auf Duplikationen des α -SYN Gens zurückzuführen, was bedeutet, dass bereits erhöhte Mengen dieses Proteins ausreichen um die Krankheit auszulösen (Singleton et al., 2003). Das verwendete Thy1-A30P α -SYN Mausmodell

weist neben der gesteigerten Proteinexpression eine krankheitsverursachende Mutation auf, und beinhaltet somit zwei pathogene Trigger. Die Situation in Alzheimermäusen ist sogar noch etwas komplizierter: Um einen Phänotyp zu reproduzieren, welcher einige Aspekte der menschlichen Krankheit aufweist, müssen zwei oder sogar drei mutierte Proteine überexprimiert werden, wie beispielsweise in den dreifach transgenen APP/PS-1/Tau Alzheimer Mäusen (Oddo et al., 2003), die standardmäßig in der Forschung eingesetzt werden, da noch keine besseren Alternativen zur Verfügung stehen. Neben der systemischen oder lokalen Gabe von Neurotoxinen (MPTP; 6-OHDA; Blandini und Armentero, 2012) ist alternativ noch das Einschleusen von krankheitserregenden Proteine durch virale Vektoren (Platt et al., 2013) oder der Einsatz von ‚*Spreading*‘ Mausmodellen (Jellinger, 2012; Olanow und Brundin, 2013) denkbar, welche auf der Prionen-ähnlichen Induktion und Ausbreitung von abgesonderten Proteinen, einem synergistischen Effekt von Tau, A β und α -SYN, basieren.

In dieser Arbeit wurde die Thy1-A30P α -SYN Maus (Kahle et al., 2000) als ein geeignetes Mausmodell für die vererbte, frühe Form der Parkinsonkrankheit mit (i) pathologischen Proteinveränderungen in Mitralzellen, den wichtigsten synaptischen Partnern von adult-geborenen Neuronen, identifiziert. Diese Lokalisation der α -SYN Pathologie stimmt mit der Situation im Parkinsonpatienten überein (Ubeda-Banon et al., 2010). (ii) Sechs Monate alte A30P α -SYN Mäuse zeigen Störungen in der Geruchsdiskriminierung, die ebenfalls in der frühen Stufe der menschlichen Krankheit auftreten (Doty et al., 1989; Liberini et al., 2000). (iii) Die A30P α -SYN Überexpression unter dem neuronalen Thy1-Promoter beginnt relativ spät verglichen mit anderen Mausmodellen (Winner et al., 2004; Winner et al., 2008), die humanes α -SYN bereits in Vorläuferzellen exprimieren, jedoch keine Anzeichen der ‚klassischen‘ α -SYN Pathologie aufweisen. Aus diesen Gründen wird das gewählte Mausmodell als besonders geeignet eingestuft zur Untersuchung des Reifungs- und Integrationsprozesses von adult-geborenen Nervenzellen in einem α -SYN beladenen Netzwerk für die Ursachenaufklärung der Riechstörungen beim frühen Parkinson.

Mit dieser Arbeit wurde erstmals die genaue zeitliche Einordnung des Zellverlustes von neugeborenen Nervenzellen während/nach ihrer Integration aufgrund von aggregationsanfälligem A30P α -SYN in einer ersten chronischen Intravitalmikroskopiestudie im Riechkolben von Parkinsonmäusen gezeigt. Durch die Kombination der *in vivo* Zwei-Photonen-Mikroskopie mit der zeitkodierten Markierung von adult-geborenen Nervenzellen, morphologischen und elektrophysiologischen Analysen in den A30P α -SYN Mäusen wurden darüber hinaus die funktionellen Auswirkungen von schädlichem α -SYN auf die Reifung und Integration der neuen Zellen im neuronalen Netzwerk des

Riechkolbens bestimmt. Die Arbeit liefert originale und explizite Beweise, dass die apikalen Dendriten von Körnerzellen mit ihren dendrodendritischen Synapsen den primären Angriffsort der zerstörenden Effekte des pathologischen α -SYN darstellen, wobei ein beträchtlicher Schwund in der Ausdehnung und Verzweigung von Dendriten und ein substantieller Rückgang in der Spinedichte und Plastizität während der kritischen Phase der Nervenzellentwicklung nachgewiesen werden konnte. Aus funktioneller Perspektive führten diese strukturellen Veränderungen zu einem beträchtlichen Anstieg der intrinsischen Erregbarkeit von neuen Körnerzellen und einer Störung ihrer erregenden postsynaptischen Ströme, was offenbar in einer verminderten integrativen Fähigkeit resultierte. In Anbetracht der strategischen Rolle von Körnerzellen bei der Regulierung und Feinabstimmung der Netzwerkdynamiken des Riechkolbens und der Tatsache, dass apikale Dendriten den einzigen Output der Körnerzellen darstellen, haben die in dieser Arbeit beschriebenen Veränderungen vermutlich einen bedeutenden Einfluss auf die Verarbeitung von sensorischen Eingangssignalen und auf die efferente Kodierung, und liefern wichtige Hinweise zum Verständnis der zellulären Grundlagen von Riechstörungen im Frühstadium des Morbus Parkinson.

4 Materialien und Methoden

4.1 Mausexperimente

Der Großteil der Arbeit basiert auf tierexperimentellen Experimenten an der Maus. Alle beschriebenen Tierversuche sind Inhalt des Tierversuchsantrages Az. 55.2-1-54-2531-184-09, der durch die Ludwig-Maximilians-Universität und die Regierung von Oberbayern geprüft und genehmigt wurde. Grundsätzlich wurde zum Schutz der Tiere entsprechend den Richtlinien des Instituts der Neuropathologie und der Regierung von Oberbayern gearbeitet. Im Folgenden werden die verwendeten Mauslinien, die Mauhaltung und die verschiedenen tierexperimentellen Versuche erklärt. Diese umfassen die Implantation eines kranialen Fensters für die *in vivo* Zwei-Photonen-Mikroskopie, Virus- und BrdU-Injektionen zur Markierung, sowie qualitativen und quantitativen Untersuchung adult-geborener Neurone, Geruchstests und die Perfusion der Versuchstiere für die anschließende immunhistochemische Untersuchung der Gehirne.

4.1.1 Mauslinien

A30P α -SYN

Drei Punktmutationen in der kodierenden Region des α -SYN Gens (A53T, A30P und E46K), sowie Duplikationen und Triplikationen genomischer Regionen, die das Gen einschließen, führen zur autosomal-dominant vererbten Parkinsonschen Erkrankung (Polymeropoulos et al., 1997). Patienten, die heterozygot eine A30P Mutation im Genom tragen, entwickeln eine aggressive Form des Morbus Parkinson mit frühem Krankheitsbeginn (Krüger et al., 1998). Die hier verwendete Mauslinie überexprimiert humanes A30P α -SYN unter Kontrolle des Neuronen-spezifischen Thy1-Promoters (Kahle et al., 2000). Dabei ist die Expression des transgenen Proteins etwa doppelt so hoch wie die endogenen α -SYN Spiegel. Das Protein wird, gleichermaßen in männlichen und weiblichen Tieren, im gesamten Gehirn exprimiert. Das Expressionsmuster im Riechkolben ist in Abbildung 2.2 dargestellt. Die transgene Mauslinie wurde von Boehringer Ingelheim bezogen und homozygot auf dem genetischen Hintergrund C57BL/6J gezüchtet. Die Genotypisierung erfolgte mittels PCR zum Nachweis des humanen A30P α -SYN (*forward primer*: ATG GAT GTA TTC ATG AAA GG; *reverse primer*: TTA GGC TTC AGG TTC GTA G) (Abbildung 4.1).

α -SYN Knockout

Dieser Knockout Linie fehlt das α -SYN Gen. Bei der Generierung der Mäuse wurde mittels RT-PCR das Fehlen der α -SYN Transkripte nachgewiesen und somit bewiesen, dass kein funktionelles Gen vorhanden ist (Abeliovich et al., 2000). Zudem wurde durch Westerblot-Analyse die Abwesenheit des Proteins im Gehirn der Mäuse bestätigt. α -SYN Knockout (KO) Mäuse zeigen keine neuroanatomischen Auffälligkeiten und besitzen eine regelhafte Anzahl an dopaminergen Zellkörpern, Fasern und Synapsen. Im Rahmen der Arbeit wurden die Mäuse zur Aufklärung der Rolle des α -SYN Gens auf die dendritische und synaptische Reifung und das Überleben adult-geborener Neurone verwendet. Die Genotypisierung erfolgte mittels PCR zur Bestätigung des Mangels an murinem α -SYN durch Ausbleiben der Wildtyp-Bande (*forward primer*: GGC GAC GTG AAG GAG CCA GGG A; *reverse primer*: CAG CGA AAG GAA AGC CGA GTG ATG TAC T) und Auftreten einer transgenen Bande (*forward primer*: CTG AAT GAA CTG CAG GAC GA; *reverse primer*: ATA CTT TCT CGG CAG GAG CA) (Abbildung 4.1). Die Mäuse wurden von Jackson Laboratories bezogen und homozygot gezüchtet.

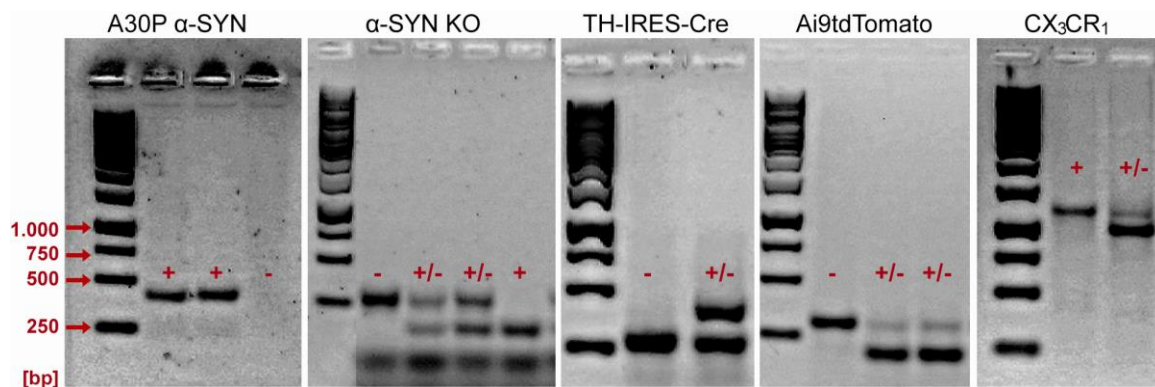


Abbildung 4.1: Darstellung von Bandenmustern zur Genotypisierung der Mauslinien. Die Bande des Transgens bei 450 Basenpaaren (bp) ermöglichte die Unterscheidung zwischen Wildtyptieren (ohne Bande) und transgenen Tieren in A30P α -SYN Mäusen. In α -SYN KO Mäusen indizierte eine einzelne Bande 172 bp den vollständigen Knockout beider α -SYN Allele, während zwei Banden, bei 172 bp und 320 bp den Knockout von nur einem Allel anzeigte. Bei der heterozygot gezüchteten TH-IRES-Cre Linie zeigten zwei Banden bei 290 bp und 430 bp den transgenen Genotypen an, während die alleinige Bande bei 290 bp den Wildtyp darstellte. In der ebenfalls heterozygoten Ai9tdTomato Linie waren die 196 bp und 297 bp Banden charakteristisch für das Transgen, während die höhere Bande bei 297 bp den Wildtyp anzeigte. In CX₃CR₁ Tieren konnten drei Genotypen unterschieden werden. Eine Bande bei 970 bp indizierte Wildtyptiere (nicht gezeigt), die zwei Allele des CX₃CR₁-Gens besaßen. Zwei Banden bei 970 bp und 1.100 bp zeigten an, dass ein Allel des CX₃CR₁-Gens durch das Gen von GFP ersetzt wurde. Eine einzelne Bande mit 1.100 bp bestätigte, dass zwei Allele des GFPs vorhanden und das CX₃CR₁-Gen komplett verloren war. Der Bandenverlauf des Standards mit seiner charakteristischen Verteilung von Basenpaaren (bp, rot) ist jeweils links dargestellt.

TH-IRES-Cre-Driver

Tyrosine hydroxylase (TH) ist das wichtigste limitierende Enzym im Dopamin-Stoffwechsel (Molinoff und Axelrod, 1971) und wird deshalb als Marker für dopaminerge Neurone verwendet. Die TH-IRES-Cre-Knockin Mäuse von Lindeberg et al. (2004) exprimieren Cre-Rekombinase vom 3'-untranslatierten Ende des endogenen TH-Gens durch eine interne ribosomale Eintrittssequenz (IRES). Die daraus resultierende Cre-Expression stimmt mit der normalen Genexpression von TH überein. Durch Verkreuzung der TH-IRES-Cre-Driver Linie mit Cre-Reporter Linien, wie z.B. Z/EG-lacZ-Cre-Reporter (Novak et al., 2000) oder mit Mäusen, die vor dem Fluoreszenzgen ein *loxP*-flankierendes STOP-Codon tragen (Madisen et al., 2010), werden gezielt dopaminerge Neurone in der Maus markiert (Abbildung 4.2). Die TH-IRES-Cre Linie wurde von EMMA bezogen, und heterozygot mit C57BL/6J Wildtypstieren gezüchtet. Mit folgenden PCR-Primern wurden die Mäuse genotypisiert: GAT ACC TGG CCT GGT CTG (*forward primer*), CAC CCT GAC CCA AGC ACT (*reverse primer*) und CTT TCC TTC CTT TAT TGA GAT (Abbildung 4.1).

Ai9 tdTomato-Cre-Reporter

Ai9 tdTomato Mäuse sind hemizygot für das konditionelle Rosa-CAG-LSL-tdTomato-WPRE Allel (Madisen et al., 2010). Eine *loxP*-flankierende STOP-Kassette verhindert die Transkription des nachgeschalteten, rot fluoreszierenden Proteins tdTomato. Erst nach Kreuzung mit Cre-exprimierenden Mäusen wie der TH-IRES-Cre Linie, wird den Nachkommen der F1-Generation die STOP-Kassette an den *loxP*-Stellen durch das Cre-Enzym herausgeschnitten, und tdTomato in Cre-exprimierendem Gewebe exprimiert (Abbildung 4.2). Die Ai9 tdTomato Cre-Reporter Linie (Jackson Laboratory) wird heterozygot durch Verpaarung mit C57BL/6J Wildtypstieren gezüchtet. Genotypen wurden mittels PCR für tdTomato (*forward primer*: CTG TTC CTG TAC GGC ATG G; *reverse primer*: GGC ATT AAA GCA GCG TAT CC) bestimmt (Abbildung 4.1).

CX₃CR₁

In dieser Mauslinie wurde das murine von Mikroglia exprimierende CX₃CR₁-Gen (Fraktalkine1-Rezeptor) durch ein verbessertes grün fluoreszierendes Protein (eGFP) ersetzt (Jung et al., 2000). Die Mäuse wurden in dieser Arbeit dazu verwendet, Mikrogliazellen, welche den Fraktalkine1-Rezeptor in hohem Maße exprimieren, mittels Zwei-Photonen-Mikroskopie über längere Zeiträume zu beobachten. Dieses Experiment zielte darauf ab, das Ausmaß der durch die Implantation bedingten Entzündungsreaktion (Glioze), an der Mikroglia beteiligt sind, *in vivo* zu ermitteln. Die Linie wurde ebenfalls

von Jackson Laboratories bezogen und heterozygot durch Verpaarung mit C57BL/6J Wildtyptieren gezüchtet. Die Genotypisierung der CX₃CR₁ Mauslinie ist in Abbildung 4.1 dargestellt. Für Kontrollexperimenten wurden C57BL/6J Mäuse (Jackson Laboratory) als Wildtyptiere verwendet. Für die Untersuchung des Umsatzes dopaminerger Neurone wurden TH-Kontrollmäuse verwendet, die durch Verkreuzung von TH-IRES-Cre mit Ai9 tdTomato-Cre-Reporter Mäusen entstehen (Abbildung 4.2). Alle transgenen Linien sind lebensfähig, fruchtbar und weisen keine offensichtlichen gesundheitlichen Beeinträchtigungen auf.

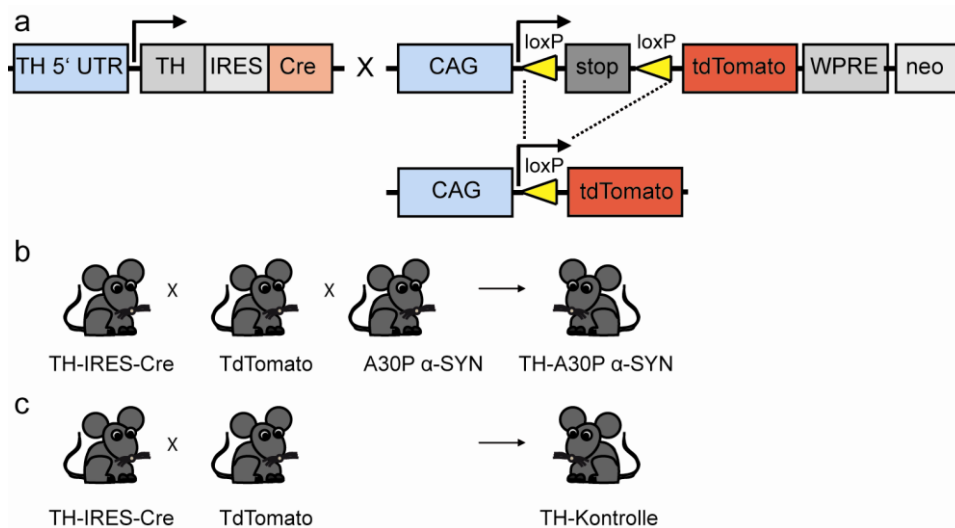


Abbildung 4.2: TdTomato-Expression unter der Kontrolle des TH-Promotors. (a) Durch Verkreuzung von TH-IRES-Cre mit Ai9 tdTomato-Cre-Reporter Mäusen werden in den Nachkommen der F1-Generation gezielt dopaminerge Neurone markiert. Dabei wird die STOP-Kassette an den loxP-Stellen durch das Cre-Enzym herausgeschnitten, und tdTomato in Cre-exprimierendem Gewebe exprimiert. (b) Für die Markierung von dopaminergen Neuronen in einem Parkinsonmodell wurden diese Cre/lox Mäuse zudem mit A30P α-SYN Mäusen verpaart, die in der Arbeit als TH-A30P α-SYN bezeichnet wurden. (c) Für Kontrollexperimente wurden entsprechend TH-Kontrollen verwendet.

4.1.2 Maushaltung

Alle Mäuse wurden in Standard-IVC-Käfigen spezifiziert pathogenfrei (SPF) und in einem normalen 12 h Tag/Nacht Rhythmus gehalten, wo sie freien Zugriff auf Wasser und Futter (Sniff) hatten. Der Gesundheitszustand der Tiere wurde durch tägliche Inspektionen überprüft, und kranke Mäuse mit Anzeichen von Entzündungen oder metabolischen Beeinträchtigungen wurden entsprechend behandelt. Bis zum Experimentbeginn wurden die Mäuse in Gruppen von bis zu 6 Tieren in einem zentralen Tierstall gehalten. Im Alter von 3 Wochen wurden junge Mäuse abgesetzt und zur Identifizierung mit Ohrmarken versehen. Für die entsprechende Genotypisierung wurde eine kleine Schwanzbiopsie entnommen. Mindestens einen Tag vor Experimentbeginn wurden die Mäuse in eine externe Tierhaltung überführt, wo sie nach der Operation einzeln gehalten wurden, um beispielsweise ein gegenseitiges Aufkratzen der

Operationsnarben zu verhindern. Im Versuch wurde besonders auf einen schonenden Umgang mit den Tieren geachtet, um die Belastung so gering wie möglich zu halten.

4.1.3 Implantation eines kranialen Fensters für die Intravitalmikroskopie

Die Implantation eines kranialen Fensters über beide Riechkolben nach der *open-skull* Methode (engl. für geöffnete Schädeldecke) wurde im Labor von Prof. Adi Mizrahi (Hebrew University, Jerusalem) im Rahmen einer EraNet Neuron Kooperation erlernt, und nach einem Protokoll von Yoav Adam (Adam und Mizrahi et al., 2011) durchgeführt (Abbildung 4.3a-d). Vor dem chirurgischen Eingriff wurde das Operationsbesteck (FST) sterilisiert (Hot Bead Sterilizer, FST). Die Maus wurde ihres Gewichtes entsprechend durch intraperitoneale (i.p.) Injektion mit einem Gemisch aus Ketamin (0,13 mg/g Körpergewicht; WDT) und Xylazin (0,01 mg/g Körpergewicht; Bayer Health Care) in eine tiefe Narkose gelegt. Zusätzlich wurde der Entzündungshemmer Dexamethason (0,02 ml in 4 mg/ml; Sigma) zur Beruhigung und Abschwellung des Gehirngewebes intraperitoneal verabreicht. Während der Operation wurde die normale Körpertemperatur der Maus durch ein Heizpad (FST) aufrechterhalten. Um die Augen vor Austrocknung zu schützen, wurden diese mit Bepanthen Salbe (Bayer) bedeckt. Nachdem die erfolgreiche Narkose durch Ausbleiben des Zwischenzehenreflexes der Maus garantiert war, wurde diese in einem Stereotakten eingespannt (StoeltingCo). Der Kopf der Maus wurde mit 70% Ethanol gewaschen, und die Kopfhaut über der Schädeldecke zum Riechkolben mit Schere und Pinzette entfernt, wobei besonders darauf geachtet wurde, die angrenzenden Augenpartien nicht zu verletzen. Unter einem Mikroskop (Olympus SZ51 mit Kaltlicht-Schwanenhalslampe KL1500LED) wurde der Schädelknochen mit Pinzette und Skalpell sorgfältig gesäubert, und die Schädeloberfläche mit einer spitzen Injektionskanüle leicht aufgeraut. Mit einem Biopsiestempel (3 mm, Miltex) wurde über beiden Riechkolben direkt frontal der unteren Gehirnvane eine kreisrunde Markierung gesetzt, die eine positionsgenaue Kraniotomie erleichterte. Weiter wurde der Schädelknochen entlang der Markierung durch vorsichtiges Bohren mit einem Dentalbohrer (Schick C1-Master, Weithas; mit rundem Stahlbohrer 1 mm, Miltex) soweit ausgedünnt bis eine Bruchlinie über dem gesamten Kreis entstand. Knochenspäne wurden kontinuierlich mittels Vakuumpumpe (CVC2000; Vacuubrand) entfernt. Der beinahe lose Knochen wurde mit Hilfe einer feinen Pinzette vorsichtig nach oben abgenommen, und die freigelegte Gehirnoberfläche wurde mit sterilem PBS gespült und mit der Pinzette gesäubert. Blutungen wurden mit Hilfe von kleinen, in PBS getränkten Schaumstückchen (Gelfoam, Pfizer) gestillt. Ein rundes Deckglas mit 3 mm Durchmesser (VWR) wurde vorsichtig auf das Gehirn gelegt und leicht angedrückt, und überflüssiges PBS am Fensterrand mit sterilen Watteschwämmchen (Sugi, Kettenbach)

4 Materialien und Methoden

abgesaugt. Mit einer feinen Glaskanüle (World Precision Instruments; Narishige PC-10 Puller) wurde eine dünne Schicht aus Histoacrylkleber (B. Braun) um das Fenster aufgetragen, die das Glas an den Knochen fixierte und eine saubere Abdichtung des Gehirns schaffte. Um die Festigkeit des Glases am Knochen zu stärken und dem für die Mikroskopie benötigten Wasser Halt zu geben, wurde zusätzlich ein Rand aus frisch angerührtem Dentalzement (Cyano Veneer fast; Hager & Werken) ringförmig um das Fenster appliziert. Für das wiederholte Mikroskopieren der Maus in einer selbstgebauten stereotaktischen Halterung (Abbildung 4.3b), wurde zudem ein 0,1 g leichter Metallstift parallel zum Fenster auf den Schädel geklebt. Zur Veranschaulichung wurde der Aufbau des chronisch kranialen Fensters über den Riechkolben in Abbildung 4.3a schematisch dargestellt.

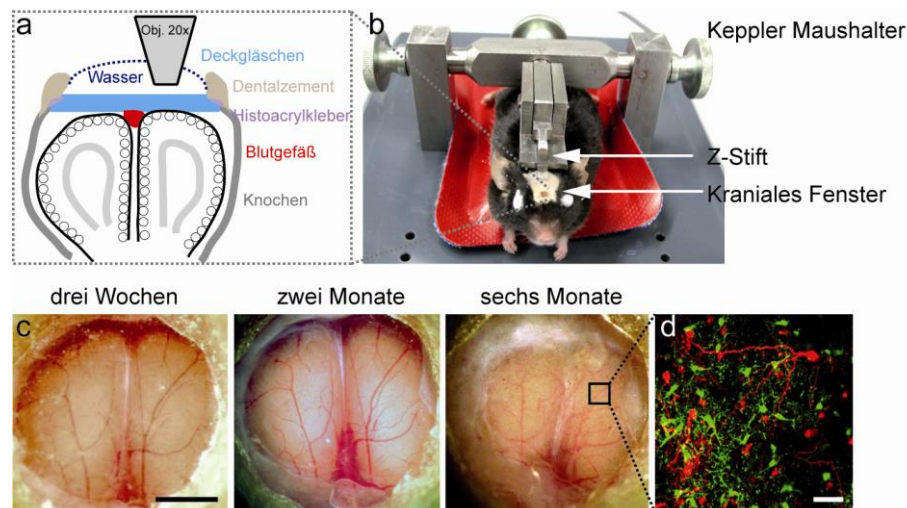


Abbildung 4.3: Implantation eines chronisch kranialen Fensters über beiden Riechkolben. (a; nach Adam und Mizrahi, 2011) Schema eines *open-skull* kranialen Fensters über beiden Riechkolben. Während der Operation musste besonders darauf geachtet werden, das zentral gelegene Blutgefäß nicht zu verletzen. (b) Durch die Befestigung eines Z-Stiftes aus Metall auf dem Schädelknochen, konnte die Maus immer wieder in einer fixierten Orientierung relativ zur Objektivlinse in die Maushalterung (Keppler) eingespannt und mikroskopiert werden. (c) Eine gute Fensterqualität wurde ab 3 Wochen nach der Operation beobachtet, die eine theoretisch unlimitierte Anzahl an Mikroskopiesitzungen ermöglichte. Maßstab - 1 mm. Knochenwachstum war die Hauptursache für eine Beeinträchtigung der Fensterqualität, wie am Rand des 6 Monate alten Fenster erkennbar ist; Ausschnitt (schwarzes Rechteck) in (d) zeigt eine repräsentative hochauflösende Aufnahme von adult-geborenen Neuronen (rot) und Mikroglia (grün) zu diesem letzten Zeitpunkt. Maßstab - 20 μ m.

Nach der Operation erhielt die Maus eine subkutane, analgetische Dosis an Carprophen (0,005 mg/g Körpergewicht; Rimadyl, Pfizer) und das Antibiotikum Cefotaxime (0,25 mg/g, Pharmore). Die Operation wurde innerhalb von 60 min durchgeführt. Danach wurden die Mäuse bis zum Erwachen aus der Narkose in einer Wärmekammer (32,7°; Isolette C200; Air-Shields Vickers) gewärmt. Erst nach einer Erholungsphase von 3-4 Wochen wurde mit dem Mikroskopieren begonnen, um den möglichen Einfluss einer

post-operativen Gliose zu vermeiden, die von anderen Gruppen für den Kortex (Lee et al., 2008) und Riechkolben (Adam und Mizrahi, 2011) beschrieben wurde. Da die Stärke der Immunreaktion möglicherweise einen Einfluss auf das Überleben und die Reifung adult-geborener Neurone hat (Ekdahl, 2012; Lazarini et al., 2012), und unter anderem von der individuellen Operationstechnik abhängt, wurde ihr Verlauf auch in dieser Arbeit beobachtet und ausgewertet (Abbildung 4.4a-d). Dazu wurden mittels Zwei-Photonen-Mikroskopie zu verschiedenen post-operativen Zeitpunkten (14, 24 und 34 Tage) mehrere Positionen unter dem kranialen Fenster bis zu 200 μm tief mikroskopiert. Das Volumen der Mikroglia sank von $71.176 \pm 20.000 \mu\text{m}^3$ (14 Tage) auf $28.030 \pm 8.471 \mu\text{m}^3$ (34 Tage) stetig ab ($p < 0,05$; Abbildung 4.4b-d). Eine optimale Qualität des Fensters wurde ebenfalls ab 3-4 Wochen nach der Operation beobachtet, die bis über mehrere Monate erhalten blieb (Abbildung 4.3c,d). In ~50-60% der Mäuse war das Fenster klar genug für ein hochqualitatives, chronisches Mikroskopieren über mehrere Wochen. Mäuse mit Fenstern, unter denen neuer Knochen gewachsen war und die Qualität des Mikroskopierens beeinträchtigte, wurden aus der Studie ausgeschlossen.

4.1.4 Injektion lentiviraler Vektoren zur Markierung von adult-geborenen Neuronen

Die stereotaktische Injektion von lentiviralen Vektoren für die Transduktion von adult-geborenen Neuronen wurde im Labor von Prof. Adi Mizrahi (Hebrew University, Jerusalem) erlernt und nach einem Protokoll von Livneh et al. (2009) durchgeführt. Die Maus wurde in tiefe Narkose gelegt (Ketamin/Xylazin 0,13/0,01 mg/g Körpergewicht) und in den Stereotakten eingespannt (Abbildung 4.5a). Mit Pinzette und Schere wurde die Kopfhaut über dem Schädel mit einem kleinen, zentralen Schnitt versehen. Beidseitig an den Enden der Kopfhaut wurde ein Stück Nähgarn (Ethicon) angenäht und die Haut zu den Seiten weggespannt, wodurch die Schädeldecke freigelegt wurde. In die Injektionsvorrichtung des Stereotakten wurde eine feine Glaskanüle geschraubt (Abbildung 4.5a,c; WPI; Narishige PC-10 Puller), die zunächst mit Mineralöl, dann mit dem auf Eis aufgetauten Virus befüllt wurde (150 nl/s). Zur Bestimmung des Koordinatennullpunktes wurde die Spitze der Glaskanüle direkt über dem Bregma platziert und die Injektionskoordinaten auf null tariert. Die planare Ausrichtung der Schädeloberfläche wurde sowohl durch optische Kontrolle, als auch durch Messen des Abstandes der Glaskanüle zum Schädel (z-Richtung) an verschiedenen Punkten der Oberfläche, erzielt. Vom Bregma aus wurden die Koordinaten für den RMS (relativ zum Bregma: nach vorne 3,3 mm, seitlich 0,8 mm, tief 2,9 mm) bzw. die SVZ (nach vorne 1,0 mm, seitlich 1,0 mm, tief 2,2 mm) angefahren und an den entsprechenden Stellen mit dem Bohrer kleine Markierung gesetzt, die als kleine Löcher durchbohrt wurden (Schick C1-Master Dentalbohrer, Weithas; mit rundem 1 mm Stahlbohrer, Miltex).

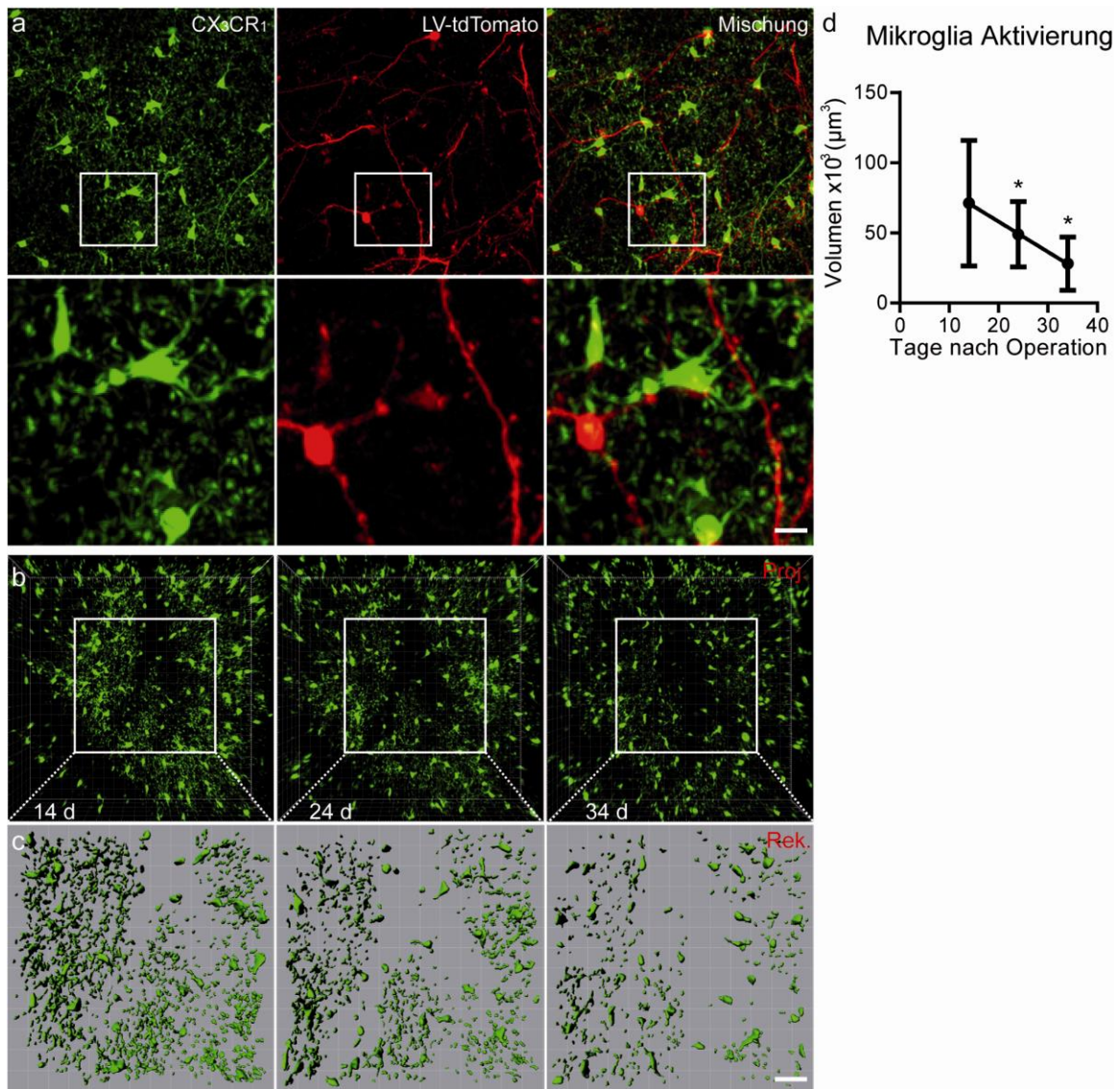


Abbildung 4.4: Kinetischer Verlauf der Mikroglia-Aktivierung nach einer Kraniotomie. Die post-operative Aktivierung von Mikroglia könnte möglicherweise das Überleben und die Reifung von adult-geborenen Neuronen im Riechkolben beeinflussen. (a) *In vivo* zwei-photonen-mikroskopische Aufnahmen adult-geborener Neurone (roter Kanal), Mikroglia (grüner Kanal) und ihrer Überlagerung: z-Projektionen von Bildstapeln; inklusive stärkerer Vergrößerung der Ausschnitte (weiße Rechtecke) - Maßstab 10 μm . Für die Markierung von Mikroglia wurden transgene Mäuse verwendet, in denen das murine CX₃CR₁-Gen (Fraktalkine1-Rezeptor) durch das erhöht grün fluoreszierende Protein eGFP ersetzt wurde. Adult-geborene Neurone wurden durch Injektion von LV-tdTomato markiert. (b) Mittels Zwei-Photonen-Mikroskopie wurden zu verschiedenen post-operativen Zeitpunkten mehrere Positionen unter dem kranialen Fenster bis zu einer Tiefe von 200 μm mikroskopiert: z-Projektionen von dreidimensionalen Bildstapeln zeigen die Verteilung von Mikroglia 14, 24 und 34 Tage nach der Operation. (c) Für eine quantitative Auswertung der Mikroglia zur Evaluierung des Schweregrades der Gliose wurden die Mikroglia mit Hilfe der Imaris Software rekonstruiert - Maßstab 20 μm , und (d) nach ihrem Volumen (μm^3) ausgewertet. Ein stetiger Rückgang der Gliose war nach 24 und 34 Tagen sichtbar (n=5 Mäuse); *p<0,05; lineare Regression.

Die Öffnungen wurden mit Saugtupfern (Kettenbach) von Blut und Knochenspänen befreit bis die Gehirnoberfläche deutlich sichtbar wurde. Durch vorsichtiges Ansetzen der Kanülenspitze auf dem Gehirn wurde der finale Injektionsnullpunkt bestimmt. Die Kanüle wurde langsam in z-Richtung in das Gewebe gefahren, wobei die Eindringtiefe über die

Digitalanzeige des Mikromanipulators verfolgt wurde. Der Virus wurde durch Druck über eine Mikroelektrode injiziert (250 nl/min). Die Mäuse erhielten beidseitige Injektionen in die SVZ (je 500 nl) und/oder in den RMS (je 300 nl). Es wurden Lentiviren mit einem Titer von $>10^8$ infektiösen Einheiten pro ml verwendet, die Fluoreszenzgene für eGFP oder tdTomato unter Kontrolle des CAG-Promoters exprimieren. Die Produktion lentiviraler Vektoren ist unter Punkt 6.3.3 ausführlich beschrieben. Nach der Injektion wurde die Pipette sehr langsam wieder aus dem Gewebe nach oben herausgefahren, die Löcher mit einer dünnen Schicht aus Knochenwachs (B. Braun) verschlossen, und die Haut wieder vollständig vernäht.

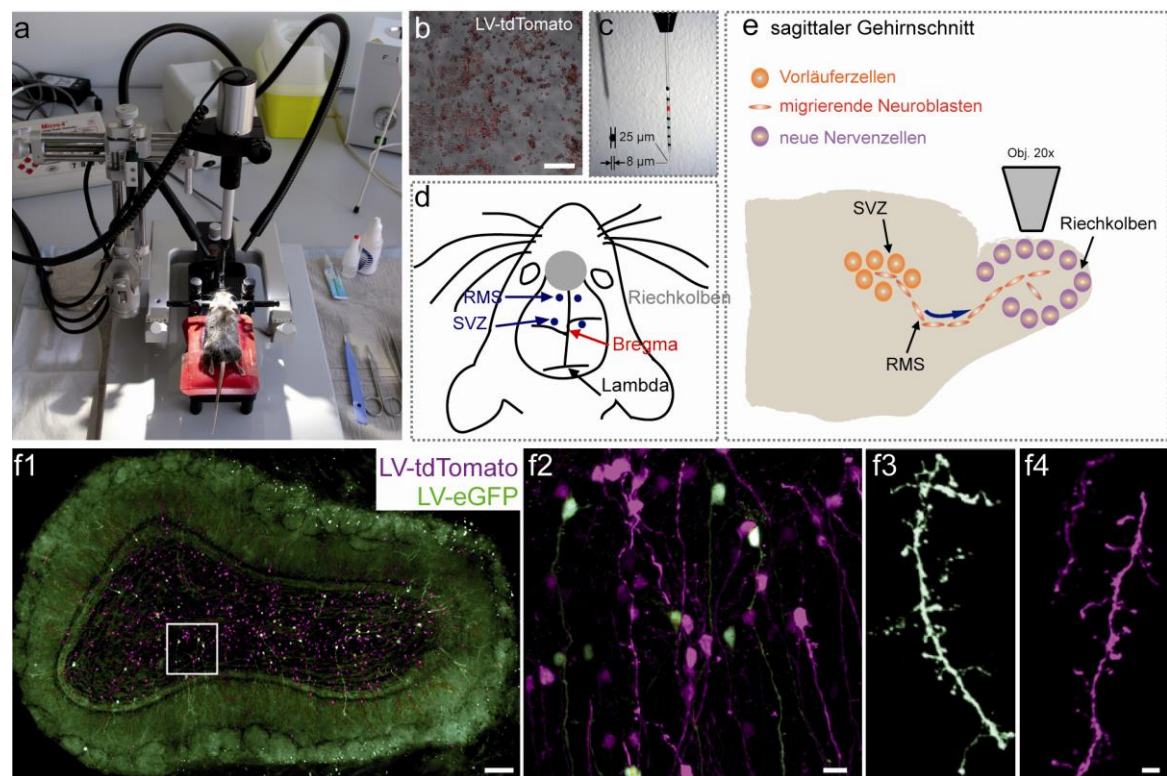


Abbildung 4.5: Setup zur stereotaktischen Injektion von lentiviralen eGFP und tdTomato Konstrukten. (a) Abbildung zeigt die Maushalterung, die motorisierten Mikromanipulatoren mit dem Pipettenhalter und die stereotaktische Vorrichtung zum gezielten Anfahren der Koordinaten auf der Schädeloberfläche. (b) Zur Markierung adult-geborener Neurone wurden Lentiviren mit einem Titer $>10^8$ infektiöse Units/ml in die Mäuse injiziert. Für die Bestimmung des Virustiters wurden HEK293-Zellen mit unterschiedlichen Verdünnungsstufen des Virus infiziert und fluoreszente Zellen ausgezählt. (c) Skalierte Glaspipette aus Borsilikat mit gezogener Spitze (Außendurchmesser 25 µm; Innendurchmesser 8 µm), die mit Virus befüllt wird. (d) Schematische Darstellung der Schädeloberfläche mit den stereotaktischen Bezugspunkten Lambda und Bregma, sowie die Injektionsstellen RMS und SVZ und die Position des Riechkolbens. (e) Sagittaler Gehirnschnitt, der die Wanderung der neugeborenen Zellen von der SVZ über den RMS bis in den Riechkolben zeigt. Dort angekommen, können unterschiedliche Entwicklungsstadien der Neurone mittels konfokaler Mikroskopie bzw. chronischer Zwei-Photonen-Mikroskopie untersucht werden. (f1) Übersichtsaufnahme des gesamten Riechkolbens (Maßstab - 50 µm) mit LV-markierten, adult-geborenen Nervenzellen, von der ein vergrößerter Ausschnitt (weißes Kästchen) in (f2) dargestellt wird: z-Projektionen von konfokalen Bildstapeln. Maßstab - 10 µm. Um junge und alte neugeborene Nervenzellen zu unterscheiden, wurden diese farbcodiert (LV-eGFP und LV-tdTomato). (f3, f4) Hinweis auf die hohe Auflösung der virus-markierten dendritischen Spines der neuen Zellen: z-Projektionen von konfokalen Bildstapeln. Maßstab - 5 µm.

4.1.5 Intravitale Zwei-Photonen-Mikroskopie

Alle *in vivo* zwei-photonen-mikroskopischen Experimente wurden an einem Zeiss LSM 7MP Setup durchgeführt, das mit einem MaiTai HP DeepSee Femtosekunden Titan:Saphir-Laser (Spectra Physics) und einem W Plan-Apochromat 20x/1,0 DIC Objektiv (Wasserimmersion; Zeiss) ausgestattet ist. Für die Zwei-Photonen-Anregung von eGFP/GFP wurde Laserlicht mit einer Wellenlänge von 880 nm eingesetzt und das emittierte Licht über den Hauptstrahlteiler LP690, einen Sperrfilter SP690 und einen Bandpassfilter BP470-550 mit einem GaAsP-Detektor (Hamamatsu) registriert. Das rot fluoreszierende Protein tdTomato wurde bei einer Wellenlänge von 915 nm angeregt. Emittiertes Licht von 527-582 nm Wellenlänge wurde mit einem Bandpassfilter BP 580-653 (über Strahlenteiler 585 nm) detektiert (Abbildung 4.6).

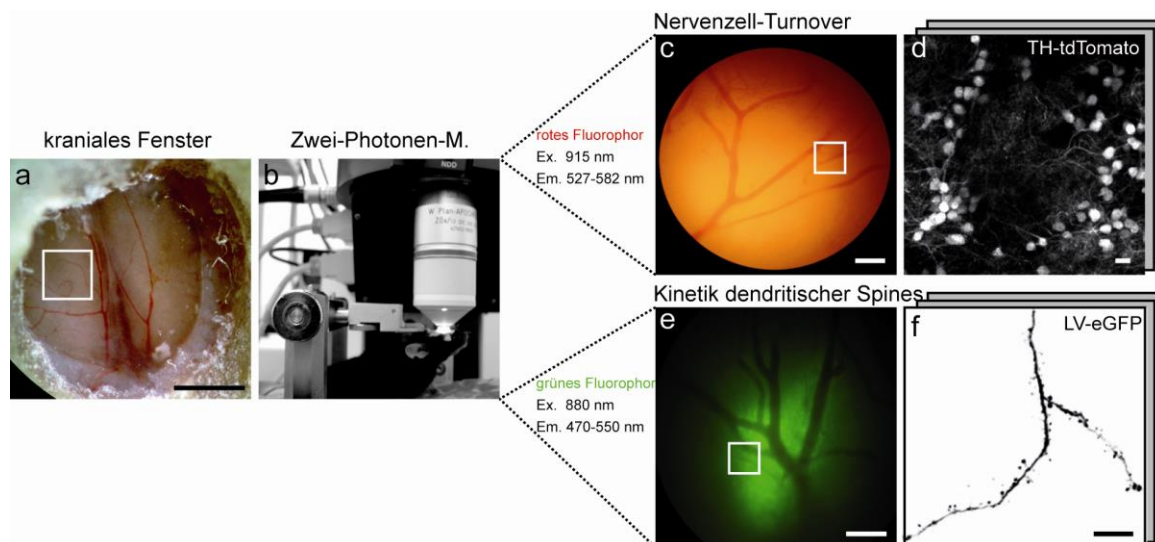


Abbildung 4.6: *In vivo* Zwei-Photonen-Mikroskopie durch ein kraniales Fenster über beiden Riechkolben. (a) Für das chronische Mikroskopieren wurde ein *open-skull* kraniales Fenster über beiden Riechkolben implantiert. Maßstab - 1 mm. (b) Die Aufnahme von fluoreszenzmarkierten Strukturen in dem ansonsten dunklen Gehirn erfolgte mit einem Zwei-Photonen-Mikroskop (7MP; Carl Zeiss), das mit einem 20x Wasser-Immersion-Objektiv (Zeiss), einem Mai Tai Deep See Femtosekundenlaser (Spectra Physics), einem hochsensitiven Detektor und diversen Filtern zur spezifischen Detektion unterschiedlicher Fluorophore ausgestattet war. Hinweis: rote bzw. grüne Fluorophore wurden mit einer Wellenlänge von 915 bzw. 880 nm angeregt, und im Bereich von 527-582 nm bzw. 470-550 nm detektiert. (c,e) Das Blutgefäßnetz auf der Oberfläche des Riechkolbens, das durch Epifluoreszenz sichtbar war, diente als Orientierungshilfe zum Wiederfinden einzelner, fluoreszenzmarkierter neuronaler Strukturen. Maßstab - 100 µm. (d,f) Repräsentative zwei-photonen-mikroskopische Aufnahmen von (d) fluoreszierenden adult-geborenen, dopaminergen Nervenzellen in TH-A30P α -SYN Mäusen, die um die olfaktorischen Glomeruli verteilt vorkommen und (f) lentiviral-markierte (LV-eGFP) apikale Dendriten von neuen Körnerzellen in A30P α -SYN Mäusen: z-Projektionen von dreidimensionalen Bildstapeln. Maßstab - 10 µm.

Für die Intravitalmikroskopie wurden die Mäuse mit einer leichten Narkose (Ketamin/Xylazin 0,01/0,0075 mg/kg Körpergewicht; i.p.) betäubt und anhand des auf dem Schädel fixierten Metallstiftes in einer Maushalterung in stabiler Position relativ zur Objektivlinse eingespannt. Zum Schutz vor Austrocknung wurden die Augen mit

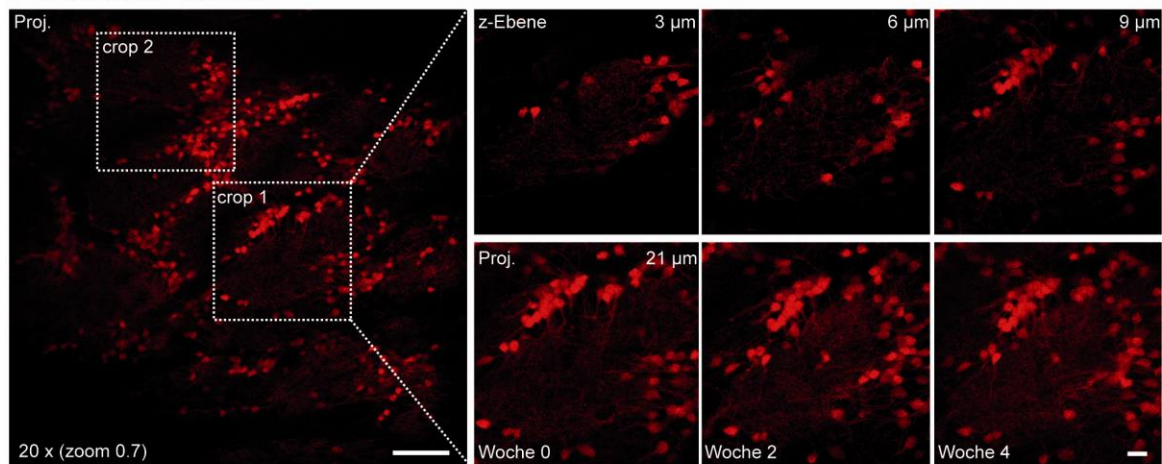
Bepanthen Salbe (Bayer) bedeckt. Das kraniale Glasfenster wurde sorgfältig mit einem Skalpell gereinigt und die Halterung mit der Maus unter dem Mikroskop platziert. Als Orientierungshilfen für das Wiederfinden bereits mikroskopierter Regionen wurden im Epifluoreszenzmodus oberflächlich gelegene Blutgefäße abgebildet (Abbildung 4.6c,e). Die Zwei-Photonen-Mikroskopie wurde in dieser Studie für zwei Hauptanwendungen genutzt: (i) Bestimmung des Nervenzell-Umsatzes von adult-geborenen dopaminergen Neuronen (Abbildungen 4.6c,d; 4.7a), und (ii) Kinetische Analyse von adult-geborenen Körnerzellspines (Abbildungen 4.6e,f; 4.7b). Zusätzlich wurde die Technik in dieser Arbeit zur Untersuchung der Morphologie von Dendritenbäumen in unterschiedlichen Reifungsstadien der neuen periglomerulären Neurone genutzt (Abbildung 4.7c).

Die Zellkörper der Körnerzellen liegen tief in der Körnerzellschicht, ihre Dendriten ragen jedoch in die oberflächlicher gelegenen Schichten (50-250 μm), die mit der Zwei-Photonen-Mikroskopie gut erreichbar sind (Abbildung 4.7). Zum wiederholten Mikroskopieren von Körnerzellspines wurden zunächst Regionen mit mehreren virus-markierten Dendriten ausgewählt, und 425x425x350 μm große Übersichtsaufnahmen mit 0.4 μm /Pixel Auflösung und einem Einzelbildabstand von 3 μm (1.024x1.024 Pixel) angefertigt (Abbildung 4.7b). Dabei wurde die Laserintensität über die Tiefe der Aufnahme angepasst. Innerhalb der Übersichten wurden einzelne apikale Dendriten lokalisiert, und mit einer hohen Auflösung von 0,08 μm /Pixel in xy-Dimension (512x512 Pixel) und 1 μm in z-Richtung abgebildet. Die stufenweise Aufnahme dieser Dendritenabschnitte erlaubte bei der chronischen Zwei-Photonen-Mikroskopie die wiederholte präzise Lokalisation der gewünschten Strukturen. Die Spinedaten von 3-10 Dendriten pro Maus stammten jeweils aus fünf hintereinander geschalteten Mikroskopiesitzungen. Um unterschiedliche Zeitpunkte der Reifung adult-geborener Körnerzellen mikroskopisch zu erfassen, wurden zwei Gruppen unterschieden. In der ersten Gruppe fand die erste Mikroskopiesitzung 3 Wochen nach kombinierter Virusinjektion und Fensteroperation statt (21 dpi). Zu diesem Zeitpunkt war die Fluoreszenzexpression des Virus hoch genug, um einzelne Spines aufzulösen. Zudem hatten die neu integrierten Nervenzellen bereits stabile Positionen eingenommen, was die Voraussetzung für das Wiederfinden der einzelnen Dendriten darstellte. Diese wurden in einem täglichen Rhythmus bis 25 dpi erneut mikroskopiert. Der Umsatz der dendritischen Spines war zu diesem Reifungszeitpunkt hoch. Außerdem befanden sich die Nervenzellen in der kritischen Phase (Yamaguchi und Mori, 2005; Kelsch et al., 2009), in der vermehrt Zelltod stattfindet, weshalb einige der initial mikroskopierten Neuronen in späteren Zeitpunkten verschwunden waren. In der zweiten Gruppe wurden die Dendriten erstmals 4 Wochen nach Virusinjektion und Operation (28 dpi) mikroskopiert, und in einem 4-Tages-Intervall bis zu 44 dpi über die Zeit verfolgt. Dieser

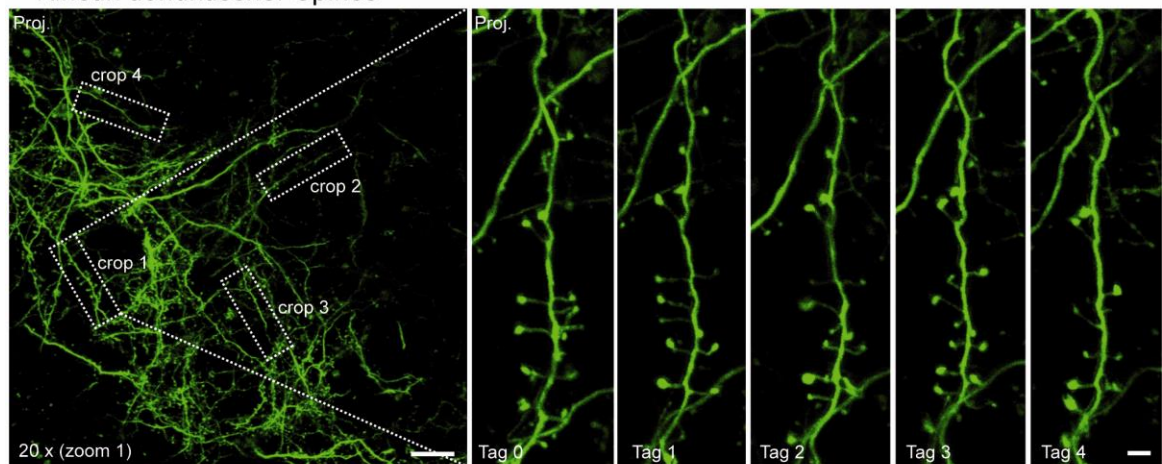
4 Materialien und Methoden

größere Abstand zwischen einzelnen Mikroskopiesitzungen wurde gewählt, da der Spineumsatz zu diesem späteren Reifungszeitpunkt geringer war. Insgesamt stellte die vereinzelte Markierung der Dendriten durch Virustransduktion einen großen Vorteil gegenüber konventionellen Tiermodellen mit fluoreszenten Neuronen, wie GFP-M oder YFP-H (Feng et al., 2000), dar.

a Nervenzell-Turnover



b Kinetik dendritischer Spines



c Kinetik dendritischer Morphologie

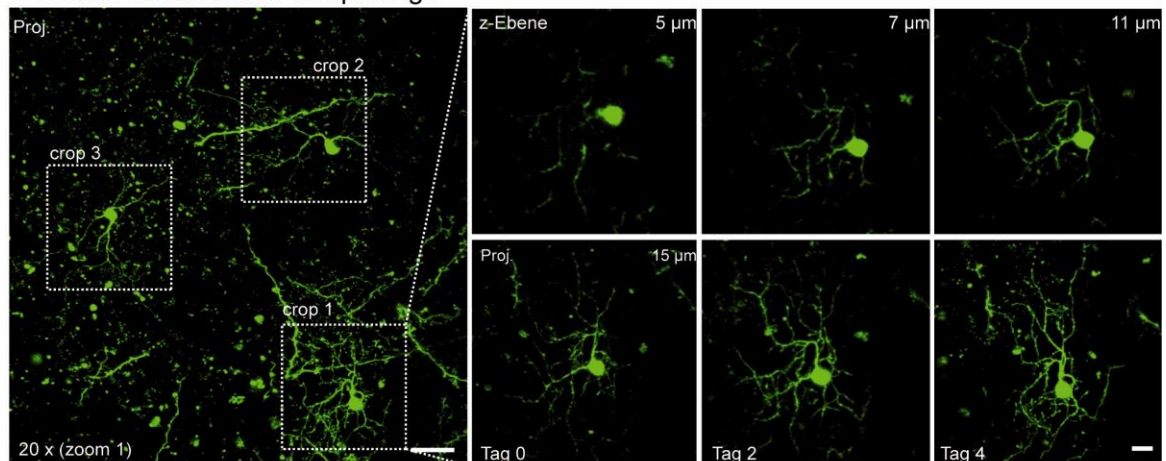


Abbildung 4.7: Anwendungen der *in vivo* Zwei-Photonen-Mikroskopie zur Untersuchung der adulten Neurogenese im murinen Riechkolben über längere Zeiträume. (a) Typische Übersichtsaufnahme von dopaminergen Neuronen in einer Tiefe von ca. 0-150 μm in einer TH-Kontrolle Maus: z-Projektion eines dreidimensionalen Bildstapels (z-Abstand: 3 μm). Maßstab - 50 μm . Aus der Übersicht wurden mehrere, kleinere Einzelausschnitte gewählt (engl. *crop*), in denen der Nervenzellumsatz unter stärkerer Vergrößerung über die Zeit ausgewertet wurde. Maßstab - 10 μm . (b) Repräsentative Übersichtsaufnahme der virusmarkierten Dendriten (LV-eGFP) von Körnerzellen, die in einer Tiefe von ca. 50-200 μm mikroskopiert wurden: z-Projektion eines dreidimensionalen Bildstapels (z-Abstand: 3 μm). Maßstab - 50 μm . Hochaufgelöste Detailaufnahmen (Einzelbildabstand: 1 μm) zeigen einzelne Dendritenabschnitte mit Spines, die über die Zeit verfolgt wurden. Maßstab - 5 μm . (c) Typische Übersichtsaufnahme von LV-markierten adult-geborenen periglomerulären Neuronen in einer Tiefe von ca. 0-150 μm : z-Projektion eines dreidimensionalen Bildstapels (z-Abstand: 3 μm). In höherer Auflösung wurden Änderungen in der Morphologie dendritischer Bäume in unterschiedlichen Reifungsstadien dieser Zellen untersucht (z-Abstand: 1 μm). Maßstab - 10 μm . Hinweis: Alle Aufnahmen sind charakteristisch für die kinetischen Analysen von Nervenzellen und dendritischen Spines, die in dieser Arbeit vorgestellt wurden.

Für das chronische Mikroskopieren von dopaminergen Nervenzellpopulationen in transgenen TH-A30P α -SYN und TH-Kontrolle Mäusen (Abbildung 4.7a) wurden Bilder mit einer Gesamtgröße von 607x607x53 μm und einer Auflösung von 0,6 μm /Pixel in xy-Richtung (1024x1024 Pixel) und 3 μm in die z-Dimension aufgenommen. Dabei waren die einzelnen Positionen durch das charakteristische Verteilungsmuster der Neurone um die Glomeruli leicht wiederzufinden. In der ersten Mikroskopiesitzung wurden für jede Maus 2-4 Positionen innerhalb der glomerulären Schicht im linken und rechten Riechkolben ausgewählt und mikroskopiert. In einem 2-Wochen-Intervall wurden die gleichen Positionen für insgesamt 6 Zeitpunkte erneut aufgesucht und aufgenommen. Dabei wurden die gleichen Bildvolumina über einen Gesamtzeitraum von 2,5 Monaten präzise justiert. In beiden Versuchsdurchführungen wurde besonders darauf geachtet, die Signalintensität der Fluoreszenz von eGFP bzw. tdTomato innerhalb des mikroskopierten Volumens und über die Zeit konstant zu halten. Um Phototoxizität zu vermeiden, wurde eine Anregungsenergie von 50 mW nicht überschritten.

4.1.6 Geruchstests

Um Unterschiede in der Geruchsleistung festzustellen, wurden die Mäuse im Alter von 6 Monaten auf ihre Geruchsdiskriminierung und ihr Geruchsgedächtnis geprüft (Abbildung 4.8a-d). Die Tests wurden nach einem Protokoll von Mihalick et al. (2000) und Glasl et al. (2012) durchgeführt. Vor Experimentbeginn wurden die Mäuse auf Diät gesetzt, um ein um 10% reduziertes Körpergewicht während der Trainings- und Testphase aufrecht zu erhalten. Die Geruchsstoffe wurden auf frischen Sägespänen (1 ml pro 3 g) in zwei runden Plastikgefäßen präsentiert, welche horizontal auf einem Träger aus Plexiglas befestigt und durch eine vertikale Barriere aus Plexiglas getrennt wurden (Abbildung 4.8b). Während der Trainingsphase lernten die Mäuse in einer Plastikschaale mit geruchslosen Sägespänen zu graben, und ein Stück Schokolade darin

zu finden. Für den Diskriminierungstest wurden zwei identische Schalen gleichzeitig auf dem Träger präsentiert. Zu Beginn befand sich in einem Gefäß die mit Apfelaroma (10% Phenethylacetate, Sigma) getränkte Sägespäne, während das andere Gefäß nur die mit Lösungsmittel (Diethylphthalate, Sigma) versetzten Späne enthielt. Graben der Mäuse im Schälchen mit Apfelaroma wurde ständig mit Schokolade belohnt, wodurch die Tiere lernten, das Apfelaroma (als S^+ bezeichnet) mit der Belohnung zu assoziieren. Um sicherzustellen, dass die Maus wirklich den Geruch von Apfel (nicht von Schokolade) mit der Belohnung gedanklich verknüpfte, wurde die Schokolade nun in zwei mit Geruchsstoffen versetzten Schälchen vergraben. Dabei mussten die Mäuse zwischen Apfel- (S^+) und Erdbeeraroma (S^- ; 10% Methyl-trans-cinnamate; Sigma) unterscheiden (15 erfolgreiche Versuche). Um den Schwierigkeitsgrad zu erhöhen, mussten die Mäuse verschiedene binäre Mischungen von S^+ und S^- mit stetig steigender Ähnlichkeit zwischen den Gerüchen voneinander unterscheiden: [$S^+ : S^-$] vs. [$S^+ : S^+$]: [70:30] vs. [30:70]; [55:45] vs. [45:55]; [53:47] vs. [47:53]; [51:49] vs. [49:51] und [50:50] vs. [50:50].

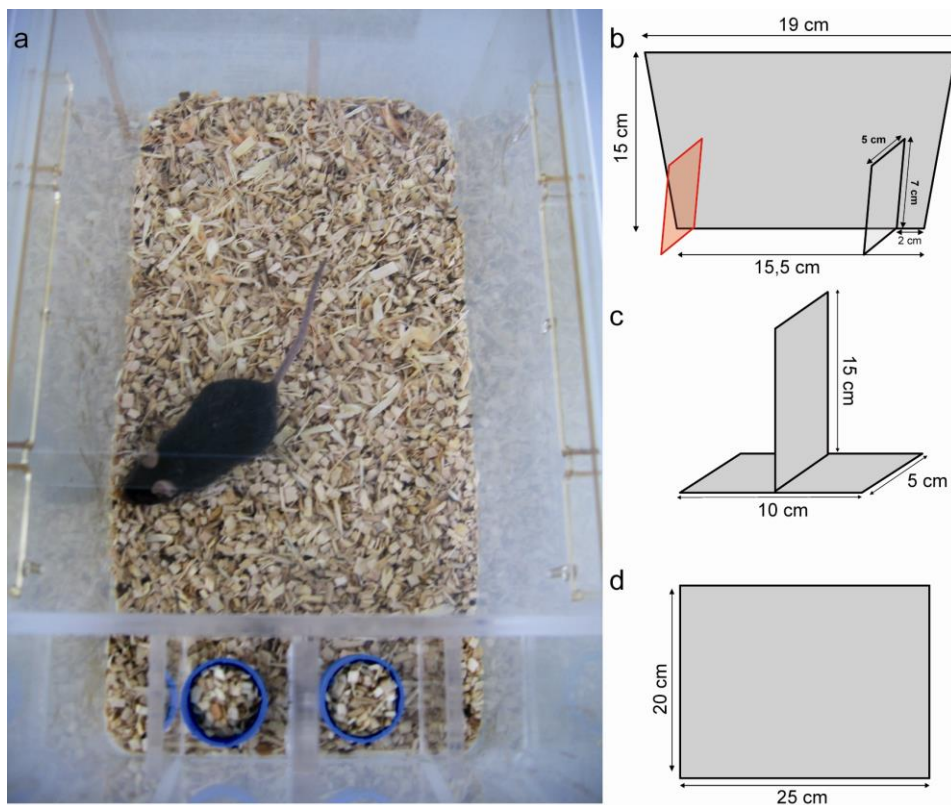


Abbildung 4.8: Experimentelles Setup zur Testung der Geruchsdiskriminierung und des Geruchsgedächtnisses von Mäusen. (a) Die Maus bewegte sich frei in ihrer gewohnten Umgebung in Standard-IVC-Käfigen. (b) Eine Barriere aus Plexiglas verhindert den Kontakt der Maus mit den Testgefäßen bis ihr Entfernen den gezielten Experimentstart initiiert. (c) Die Geruchsstoffe wurden auf frischen Sägespänen (1 ml pro 3 g) in zwei runden Plastikgefäßen präsentiert, welche horizontal auf einen Träger aus Plexiglas befestigt und durch eine vertikale Barriere aus Plexiglas voneinander getrennt sind. (d) Ein Deckel aus demselben Material verhindert das Entweichen der Maus aus dem offenen Käfig.

Eine korrekte Wahl wurde durch das Graben der Maus in dem Schälchen mit dem höheren Gehalt an S^+ definiert (8 Versuche/Tag). Eine erfolgreiche Diskriminierung wurde mit einem kleinen Stück Schokolade belohnt, während eine Fehlentscheidung (Wahl von S^-) den Versuch sofort beendete. Um Unterschiede im Geruchsgedächtnis zu erfassen, wurden die Tiere mit den gleichen Geruchsstoffen erneut nach 2 Monaten konfrontiert, und der Erfolg zur Wahl von S^+ wurde in 12 Versuchen bewertet.

4.1.7 Elektrophysiologie

Für die elektrophysiologischen Aufzeichnungen von eGFP-markierten, adult-geborenen Körnerzellen wurde 5 Monate alten Mäusen beidseitig LV-eGFP in den RMS injiziert. Zwischen 30-35 dpi wurden die Mäuse mit Isofluran (Abbott) anästhesiert und dekapitiert. Beide Riechkolben wurde präpariert, 5-6 min in eiskalte, sauerstoffbelüftete (95% O_2 , 5% CO_2) artifizielle Cerebrospinalflüssigkeit (Tabelle 4.2; ACSF_{Schneiden}) gelegt und mit einem Mikrotom (VT1200S; Leica) geschnitten, dessen Schnittkammer ebenfalls mit der eiskalten Lösung gefüllt war. Die horizontalen Gehirnschnitte (250 μm) wurden für 30 min in einer Wärmekammer (35 °C) mit ACSF (ohne Saccharose; NaCl 125 mM) aufbewahrt. Anschließend wurden die Schnitte zur Messung in eine sauerstoffbelüftete Kammer mit ACSF gegeben (Tabelle 4.2; ACSF_{Messung}). Die Aufnahmen erfolgten bei physiologischer Temperatur (35 \pm 1 °C) in der Kammer, die an ein Olympus BX51 Mikroskop befestigt wurde. Dazu wurden die Körnerzellen mit einem lichtmikroskopischen Kontrastverfahren (DIC) und Epifluoreszenz mit entsprechenden Filtern (Alexa488/GFP und Alexa574/Cy3) sichtbar gemacht, und Bilder der Zellen mit einer hochsensitiven CCD Kamera aufgenommen. Die Einschlusskriterien für die Analyse der Körnerzellen waren: (i) eindeutige eGFP Expression, (ii) Generierung von überschießenden Aktionspotentialen als Antwort auf einen depolarisierenden Reiz, und (3) Eingangswiderstand (R_{in}) größer als 300 M Ω . Analoge Signale wurden bei 5 kHz (Bessel filter) gefiltert, bei 10 kHz digital aufgezeichnet und für die anschließende *offline*-Analyse gespeichert (PatchMaster, EPC10USB). Die Patch-Pipetten aus Borosilikatglas (Vendor; P87 Puller, Sutter instruments) wurden mit K-Methylsulfat-basierender Lösung gefüllt, zu der Alexa 594 (0,5%; Invitrogen) routinemäßig hinzugegeben wurde (Tabelle 4.2; Eingangswiderstand: 6-8 M Ω). Um den Eingangswiderstand und die Membrankapazität (C_m) zu messen, wurde von einem Ruhepotential von -65 mV in 5 mV Schritten hyperpolarisiert. Diese depolarisierenden Pulse (1000 ms) wurden ausgeführt, um den Schwellenwert der Aktionspotentiale zu bestimmen. Die Veränderungen im Widerstand wurden aufgezeichnet und über die komplette Aufnahme korrigiert, wobei Aufnahmen mit Veränderungen >15% des Ursprungswertes aussortiert wurden. Die

folgenden Rezeptorenblocker wurden der Lösung in spezifischen Konzentration zugegeben: Kynureinsäure (5 mM) für ionotrope glutamaterge Rezeptoren, D-AP5 (20 μ M) für NMDA Rezeptoren und Picrotoxin (200 μ M) für GABA/Glycin Rezeptoren. Um erregende postsynaptische Miniaturströme (mEPSCs) zu messen, wurden die aktionspotential-abhängigen, spontanen erregenden postsynaptischen Ströme (sEPSCs) mit Tetrodotoxin (0,5 μ M; Biotrend) blockiert, das spannungsabhängige Na⁺ Kanäle wirksam hemmt.

4.1.8 BrdU-Injektionen

Um die Überlebensrate von adult-geborenen Neuronen im Riechkolben zu bestimmen, wurde 5 Monate alten A30P α -SYN, α -SYN-KO und Wildtypmäusen intraperitoneal (i.p.) Bromodeoxyuridine (BrdU; Sigma-Aldrich) in einer Konzentration von 50 mg/kg Körpergewicht (verdünnt in 0,9% NaCl) an fünf hintereinander folgenden Tagen injiziert (Abbildung 4.9; Winner et al., 2004). An Tag 21 bzw. 32 nach der ersten Injektion wurden die Tiere in eine tiefe Narkose versetzt und mit 4% PFA perfundiert. Zur Analyse der Proliferationsrate von neuen Zellen in der SVZ und dem RMS wurde den Mäusen eine einmalige Dosis an BrdU (100 mg/kg Körpergewicht; i.p.) injiziert, woraufhin diese 24 h später perfundiert wurden (Abbildung 4.9).

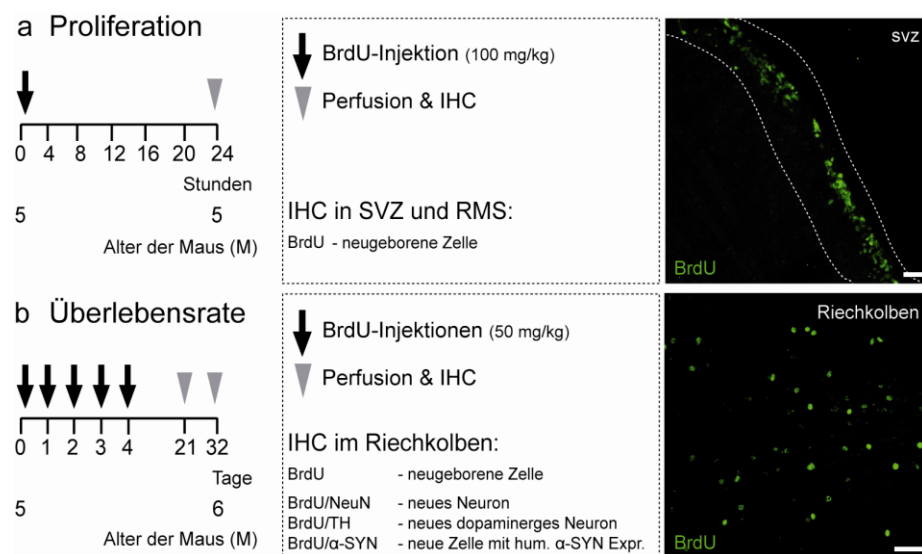


Abbildung 4.9: Experimentelles Design für BrdU-Injektionen zur Markierung und Quantifizierung von adult geborenen Neuronen in SVZ/RMS und Riechkolben. (a) Quantitative Bestimmung der Zellproliferation in SVZ/RMS. Fünf Monate alten A30P α -SYN, α -SYN-KO und Wildtypmäusen wurde eine einmalige Dosis an BrdU (100 mg pro kg Körpergewicht; in 0,9% NaCl) intraperitoneal injiziert. Nach 24 h wurden die Mäuse unter starker Narkose perfundiert, und ihre Gehirne für die anschließende immunhistologische Untersuchung (IHC) mit einem BrdU-Antikörper entnommen. Maßstab - 50 μ m. (b) Quantitative Analyse des Überlebens adult-geborener Neurone im Riechkolben. Fünf Monate alten A30P α -SYN, α -SYN-KO und Wildtypmäusen wurde an 5 hintereinander folgenden Tagen BrdU (50 mg pro kg Körpergewicht; i.p.) injiziert. An Tag 21 bzw. 32 nach der ersten Injektion wurden die Mäuse perfundiert, und ihre Gehirne immunhistologisch ausgewertet. Maßstab - 50 μ m.

BrdU ist ein synthetisches Thymidinanalogon, das sich während der S-Phase des Zellzyklus in die Tochter-DNA-Stränge sich teilender Zellen einbaut, und damit Zellen markiert, die sich in einem Zeitfenster von 2 h ab Injektion teilen. Mittels eines monoklonalen Antikörpers gegen BrdU lassen sich diese Zellen später immunhistochemisch darstellen und genau datieren (Gratzner, 1982).

4.1.9 Perfusion und Fixierung von Gehirngewebe

Zur Perfusion von Gehirngewebe wurde ein im Labor entwickelter, elektrischer Perfuser verwendet. Die Mäuse wurden mit einer letalen Dosis an Ketamin (0,2 mg/g Körpergewicht; i.p.) anästhesiert und an den Gliedmaßen fixiert. Mit Pinzette und Schere wurden Bauchdecke und Brustkorb geöffnet und das schlagende Herz freigelegt. Über eine Flügelkanüle wurde zunächst für 3 min PBS und anschließend für 6 min 4% PFA/PBS mit einer Fließgeschwindigkeit von 2 ml/min in die linke Herzkammer und damit in den Blutstrom eingeleitet, um das Blut aus dem Gehirn zu spülen. Den Ausfluss des Blutes gewährleistete die Öffnung des rechten Herzhohls durch einen kleinen Schnitt. Die erfolgreiche Fixierung konnte anhand des versteiften Mausekörpers überprüft werden. Das optimalerweise blutleere, weiße Gehirn wurde anschließend präpariert und in 4% PFA/PBS bei 4 °C über Nacht postfixiert. Fixierte Gehirne wurden in 0,01% Natriumazid/PBS bei 4 °C gelagert.

4.2 Immunhistochemische Methoden

Immunhistochemische Färbungen fixierter Gehirnschnitte wurden mittels konfokaler Mikroskopie (Fluoreszenzfärbungen) bzw. Lichtmikroskopie (DAB-Färbungen) analysiert.

4.2.1 Immunhistochemische Färbung von Gehirnschnitten

Für die Immunfluoreszenzfärbungen von endogenen, transgenen oder viral-transduzierten Proteinen wurden koronare Schnitte (50-100 µm) von PFA-fixiertem Gehirngewebe mit einem Vibratom (Leica VT1000S) angefertigt. Die Schnitte wurden in 24-well Platten (Nunc, Hartenstein) freischwimmend prozessiert. Die Permeabilisierung der Zellmembranen erfolgte in 2% TritonX-100/PBS über Nacht. Für die Färbung BrdU-positiver Zellkerne fand nachfolgend ein DNA-Denaturierungsschritt, mit 1M HCl (vorgewärmt auf 45 °C) bei 45 °C für 10 min, gefolgt von ausgiebigem Waschen, statt. Die anschließende Blockierung erfolgte mit 2% Serum und 0,3% TritonX-100/PBS in PBS. Primäre Antikörper (1:200 verdünnt) wurden im Blockierungsmedium über Nacht bzw. für die Synapsenfärbung über 2 Nächte, inkubiert. Sekundäre Antikörper wurden nach ausführlichem Waschen der Schnitte mit PBS in einer Verdünnung von 1:500

appliziert und für 4 h bzw. für die Synapsenfärbung über Nacht inkubiert. Nach einem abschließenden Waschvorgang, und teilweise zusätzlicher Zellkernfärbung mit DAPI (1:1.000 in PBS; 15 min), wurden die Schnitte auf einen Objektträger (Thermo Scientific) aufgezogen und mit Mounting-Medium (Fluorescent Mounting Medium; Dako) und Glasplättchen (170 µm; Carl Zeiss) eingedeckt.

Die Charakterisierung der α -SYN Pathologie wurde an 4 µm dicken, murinen Paraffinschnitten mittels DAB-Färbungen durchgeführt. Diese wurden zunächst für 20 min in Xylol entparaffiniert, anschließend anhand einer absteigenden Alkoholreihe (100%/96%/70%/50% Ethanol für je 5 min) rehydriert und in demineralisiertem Wasser gewaschen. Für die Detektion von fibrillärem α -SYN mittels 15G7-Antikörper wurde maschinell ein Proteinkinase K (PK) Verdau basierend auf einem Protokoll von Neumann et al. (2002) durchgeführt. Dazu wurden die Schnitte zunächst manuell mit 0,2 M Borsäure (pH 9) bei 63 °C im Wasserbad für 25 min vorbehandelt, für weitere 25 min in der Borsäure abgekühlt und ausgiebig mit destilliertem Wasser (3x) und Puffer (2x5 min in PBS; pH 7,3) gewaschen. In einer Färbemaschine (Benchmark; Roche) fand der anschließende enzymatische PK-Verdau bei 37 °C für 5-10 min in einer Konzentrationslösung von 1:1.000 (Proteinase K 50 mg/ml von Roche, verdünnt in 10 mM TrisHCl pH 7,8, 100 mM NaCl, 0,1% Brij35, destilliertem Wasser) statt. Die Schnitte wurden anschließend mit dem monoklonalen anti-15G7 Primärantikörper aus der Ratte (1:4.000 in 5% BSA, 0,1% Triton in PBS; spezifisch gegen humanes α -SYN; Connex) für 32 min bei 4 °C inkubiert. Die Schnitte wurden gewaschen (3x10 min in 1xPBS; pH 7,3) und mit biotinyliertem Sekundärantikörper aus dem Hasen anti-Ratte (DAKO; 1:300 verdünnt in 5% BSA, 0,1% Triton in PBS) bei RT für 24 min inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde die Färbung mittels DAB-Detektion für 5-10 min (Diaminobenzidin Detektions Kit, DCS Diagnostics) sichtbar gemacht.

Zur Erkennung von phosphoryliertem α -SYN unter Verwendung eines pSer129-Primärantikörpers fand nach dem Rehydrierungsschritt zunächst eine Eliminierung der Peroxidase-Aktivität durch Behandlung der Schnitte mit 3% H₂O₂ in PBS (pH 7,3) für 10 min statt. Die Antigendemaskierung wurde durch Kochen der Präparate in Citratpuffer (pH 6,0; 19,2 g Zitronensäure in 1 Liter H₂O, mit NaOH auf pH 6,0) für 5x5 min auf höchster Stufe in der Mikrowelle, und anschließendem Abkühlen und Waschen (3x5 min in PBS) bewirkt. Daraufhin wurden die Schnitte ebenfalls für 2 h in 5% NGS, 0,1% TritonX-100 in PBS geblockt, und über Nacht mit polyklonalem pSer129-Antikörper aus dem Hasen (1:500; gegen phosphoryliertes α -SYN; Abcam) inkubiert. Nach einem Waschschrift (3xPBS) wurde für 20 min 1-2 Tropfen Enhancer (Sigma) und anschließend Polymerlösung (Sigma) hinzugegeben, und die Färbung schließlich mit DAB-Detektion für 5-10 min sichtbar gemacht. In beiden Protokollen wurden die

Zellkerne mit Hämalaun (1 min; anschließend 10 min lauwarmes Wasser) blau gefärbt. Nach einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol wurden die Schnitte in Mounting-Medium (Entellan; Merck) eingedeckt, und mit einem Lichtmikroskop (Olympus BX50) mit einer Kamera (ColorView 3; Soft Imaging System) untersucht. Eine Übersicht aller in dieser Studie verwendeten Antikörper ist in Tabelle 4.1 zusammengestellt.

4.2.2 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Konfokale Laser-Scanning-Aufnahmen der immunhistochemischen Präparate wurden mit einem inversen LSM 510 Mikroskop (Zeiss) angefertigt, welches mit einem 10x, 25x oder 40x Ölimmersionsobjektiv (Zeiss) ausgestattet war. Folgende Laserlinien wurden für die Anregungs- und Emissionsspektren verwendet: Alexa488/ eGFP mit 488 nm/500-550 nm (Bandpassfilter), RFP/Alexa647 mit 633 nm/650 nm (Langpassfilter) und DAPI mit 750 nm/435-485 nm (Zwei-Photonen-Anregung). Die Bilder wurden in einer Größe von 225×225 µm mit einer Auflösung von 0,75 µm/Pixels in xy-Richtung und 1 µm in z-Richtung aufgenommen. Für die genaue Darstellung von kleinsten Strukturen (Synapsen- und Rezeptorenbestandteile), die eine besonders hohe Auflösung erforderten, wurde eine Größe von 37,50×18,75 µm und eine Auflösung von 0,07 µm/Pixels in xy-Richtung und 0,3 µm in z-Richtung gewählt. Um die Färbung der mit LV-eGFP bzw. LV-tdTomato Konstrukt markierten Nervenzellen für hochauflösende konfokale Aufnahmen zu intensivieren, wurden die Präparate vor der Mikroskopie mit anti-eGFP und anti-RFP Antikörpern nachgefärbt. Für die Spinedichteanalyse wurden 15-30 Dendriten pro Tier mit deutlicher Fluoreszenzmarkierung aufgenommen und ausgewertet. Für die einheitliche Quantifizierung von Zellen in Riechkolben und SVZ/RMS wurde jeder zehnte Gehirnschnitt ausgewählt (Yokojama et al., 2011), und festgelegte Positionen in den unterschiedlichen Zellschichten mikroskopiert.

4.2.3 Antikörper

In dieser Studie wurden folgende Primär- und Sekundärantikörper verwendet.

Tabelle 4.1: Primär- und Sekundärantikörper.

Epitop	Klonalität	Wirt	Firma
Bromodeoxyuridine (BrdU)	monoklonal	Ratte	Abcam
Bromodeoxyuridine (BrdU)	monoklonal	Maus	Millipore
Calbindin (CB)	monoklonal	Maus	Sigma
Calretinin (CR)	monoklonal	Maus	Millipore
Doublecortin (DCX)	polyklonal	Hase	Abcam
Gephyrin	monoklonal	Maus	Synaptic Systems
Humanes α -SYN (15G7)	monoklonal	Ratte	Connex
Humanes α -SYN (SYN42)	monoklonal	Ratte	Becton Dickinson

4 Materialien und Methoden

GFP-tagged Alexa 488	monoklonal	Hase	Invitrogen
GluR1 (AMPA-Rezeptoren)	monoklonal	Hase	Millipore
Neuronale Nuclei (NeuN)	monoklonal	Maus	Millipore
Phosphoryliertes α -SYN (pSer129)	polyklonal	Hase	Abcam
Rot fluoreszierendes Protein (RFP)	monoklonal	Hase	Abcam
Tyrosinhydroxylase (TH)	monoklonal	Maus	Millipore
Vesikulärer GABA Transporter (VGAT)	polyklonal	Hase	Synaptic Systems
Anti-Maus Alexa 488		Ziege	Invitrogen
Anti-Maus Alexa 647		Ziege	Invitrogen
Anti-Ratte Alexa 488		Hase	Invitrogen
Anti-Hase Alexa 488		Ziege	Invitrogen
Anti-Hase Alexa 647		Ziege	Invitrogen

4.3 Molekularbiologische Methoden

4.3.1 DNA-Präparation aus Mausschwanzbiopsien

Für die Genotypisierungen der Mäuse wurde die genomische DNA aus Mausschwanzbiopsien mit dem pegGold Tissue DNA Mini Kit (Peglab) in 96-well Platten nach Angaben des Herstellers isoliert. Die Biopsien wurden über Nacht in 400 μ l Lyse-Puffer mit ProteinaseK und RNase bei 50°C inkubiert. Nach Zentrifugation bei 10.000 U/min (1 min; Eppendorf Zentrifuge 5804) wurden zum Überstand 400 μ l DNA-Bindepuffer pipettiert, die Säulen (PerfectBind DNA Column) beladen und erneut zentrifugiert. Die Elution der genomischen DNA erfolgte mittels 200 μ l Elutionspuffer (3 min Inkubation; 1 min Zentrifugation bei 6.000 U/min) nach zweimaligem Waschen (Waschpuffer für 1 min, 10.000 U/min). Die isolierte Mausschwanz-DNA wurde bei 4°C gelagert.

4.3.2 Genotypisierung der Mauslinien mittels PCR

Die Amplifikation der DNA-Sequenzen für die Genotypisierung der Mäuse und die Klonierung des lentiviralen Vektorkonstrukts erfolgte mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Standardmäßig wurden 1 μ l genomische Maus-DNA (bzw. 5 ng Plasmid-DNA), 1-10 μ M Primer (MWG Eurofins) und 5Prime HotMasterMix (VWR) verwendet. Die PCRs wurden an Mastercycler pro Thermozyklern (Eppendorf) nach folgendem Standardprotokoll durchgeführt: (i) Prä-Denaturieren: 94 °C für 0,5-3 min; (ii) 25-35 Zyklen: $T_{\text{denaturieren}}$ 94 °C für $t_{\text{denaturieren}}$ 30 s; $T_{\text{annealing}}$ entsprechend den Primern für $t_{\text{annealing}}$ 30 s; $T_{\text{elongation}}$ 72 °C für $t_{\text{elongation}}$ entsprechend Amplifikatlänge; (iii) abschließende Elongation 72 °C für 10 min; (iv) 4 °C Kühlung. Die Amplifikate wurden auf Sybr-Gold-Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt (Gelkammer: CBS Scientific) und die Gele

mit einem Kamerasystem (Canon Powershot G1, Software: Remote-Capture) auf einem UV-Tisch (3UV Transilluminator, UVP) zur Auswertung dokumentiert.

4.3.3 Präparation lentiviraler Vektoren

Nach Dull et al. (1998) wurden lentivirale Vektoren der dritten Generation als virales Vektorsystem verwendet. Die Präparation der lentiviralen Vektorpartikel erfolgte durch die Kalzium-Phosphat-Methode nach einem Protokoll von Mistrik et al. 2005. Zunächst wurden HEK293-Zellen auf Poly-L-Lysin beschichteten 15 cm Zellkulturschalen bis zu einer Konfluenz von 60-80% gezüchtet. Mittels Kalzium-Phosphat-Präzipitation wurden die Zellen mit den Vektorplasmiden LV-CAG-eGFP (Dr. Stykianos Michalakis) oder LV-CMV-tdTomato (Prof. Adi Mizrahi) und drei Helferplasmiden pMDLg/pRRE (Addgene Plasmid 12251; gag und pol Gene), pRSV-Rev (Addgene Plasmid 12253; rev-Gen) und pMD2.G (Addgene Plasmid 12259, vsv-g-Gen für das Oberflächenglycoprotein G des Vesicular-Stomatitis-Virus) transfiziert. Die Ernte der Viruspartikel erfolgte aus den Zellkulturüberständen 48 h und 72 h nach Transfektion durch Ultrazentrifugation mit 19.400 U/min bei 17 °C für 2 h (Zentrifugenröhrchen Beckman&Coulter; Zentrifuge Beckman&Coulter Optima LE80K mit Rotor SW28). Daraufhin wurde das Viruspellet in HBSS (Gibco) resuspendiert. Beide Virusernten wurden zusammen auf ein vorgelegtes Saccharosekissen (20%) in Zentrifugenröhrchen (Beckman&Coulter) pipettiert. Das Pellet der anschließenden Zentrifugation mit 21.000 U/min für 2 h bei 17 °C (Rotor SW55) wurde in HBSS gelöst und aliquotiert bei -80 °C gelagert. Für die Bestimmung des Virustiters wurden HEK293-Zellen mit unterschiedlichen Verdünnungsstufen des Virus infiziert. Nach 48 h wurden die fluoreszenten Zellen ausgezählt und auf die unverdünnte Menge hochgerechnet (Abbildung 4.5b). Die Viren wurden mit einem Titer von $>10^8$ infektiöse Einheiten/ml in die Mäuse injiziert.

4.4 Computergestützte Datenauswertungen

4.4.1 Auswertung von Nervenzell- und Spineumsatz

Die Datenauswertung zur Dichte und Kinetik von Nervenzellen und dendritischen Spines wurde manuell von den dreidimensionalen konfokalen und zwei-photonen-mikroskopischen Bildstapeln mittels der AIM Software (Zeiss) durchgeführt. Alle Daten wurden in Excel-Tabellen erfasst und ausgewertet.

Für die Analyse von dopaminergen Neuronen wurden die Bildstapel in verschiedene kleinere Interessenregionen (ROI) eingeteilt, und zu einem Gesamtbild projiziert. Jede ROI wurde mit der gleichen Region in der vorherigen Sitzung verglichen, wobei jede

Zelle als stabil (N_{stabil}), verloren (N_{verloren}), oder neu gewonnen (N_{gewonnen}) markiert wurde. Die Umsatzrate an Nervenzellen wurde als $\text{TOR} = (N_{\text{gewonnen}} + N_{\text{verloren}}) / (2 \times N_{\text{präsent}}) / I_t$ berechnet, wobei $N_{\text{präsent}}$ die Anzahl an insgesamt vorhandenen Neuronen zu dem bestimmten Zeitpunkt, und I_t die Anzahl an Tagen zwischen den hintereinander folgenden Mikroskopiesitzungen darstellt (Fuhrmann et al., 2007). Die Nettoveränderung in der dopaminergen Neuronenpopulation wurde für jeden Zeitpunkt relativ zur ersten Mikroskopiesitzung ausgerechnet. Außerdem wurden die Einzelanteile an stabilen, neu gewonnenen, verlorenen und ‚kurzlebigen‘ Nervenzellen für jeden Zeitpunkt bestimmt. Als letztere wurden Nervenzellen definiert, welche zu einem Zeitpunkt neu dazukamen, im darauffolgenden jedoch gleich wieder verschwanden. Zusätzlich wurde die Überlebensrate der Neuronen 2, 6 und 10 Wochen relativ zur ersten Sitzung bestimmt. Die Analyse der Spines von adult-geborenen Neuronen wurde auf die apikalen Dendriten der Körnerzellen beschränkt, die in hoher Auflösung mikroskopiert und direkt in den originalen Bildstapeln quantifiziert wurden. In Zeitserien wurden die Dendriten eines jeweiligen Zeitpunkts mit dem vorherigen Zeitpunkt verglichen und für jeden Spine kontrolliert, ob dieser bereits präsent/stabil, neu entstanden oder verloren gegangen war. Dendritische Spines wurden als identisch/stabil charakterisiert, wenn sich ihre Position entlang des Dendriten um nicht mehr als 1 μm verändert hatte. Als weiterer Parameter wurde die Länge individueller Dendritenabschnitte gemessen. Daraus wurde für jeden Zeitpunkt die mittlere Spinedichte pro μm Dendrit bestimmt, und die prozentuale Veränderung der Spinedichte über die Zeit und relativ zur ersten Mikroskopiesitzung quantifiziert. Die Umsatzrate an dendritischen Spines, die den Gesamtgewinn und -verlust an Spines ausdrückt, wurde als $\text{TOR} = (N_{\text{gewonnen}} + N_{\text{verloren}}) / (2 \times N_{\text{präsent}}) / I_t$ berechnet, wobei N_{gewonnen} die Anzahl an neu gewonnenen Spines, N_{verloren} die Anzahl an verlorenen Spines, $N_{\text{präsent}}$ die Anzahl an insgesamt vorhandenen Spines zu dem bestimmten Zeitpunkt, und I_t die Anzahl an Tagen zwischen den hintereinander folgenden Mikroskopiesitzungen darstellt (Fuhrmann et al., 2007). Außerdem wurde die Überlebensrate der Spines relativ zur ersten Sitzung berechnet. Die Analyse der Stabilität von dendritischen Spines basiert auf der Anzahl an Spines, die über mindestens zwei hintereinander folgende Mikroskopiesitzungen stabil blieben.

4.4.2 Analyse der Spinemorphologie

Die morphologische Klassifizierung der dendritischen Spines erfolgte aus z-Projektionen von *in vivo* zwei-photonen-mikroskopischen Aufnahmen, die semiautomatisch mit der Software Imaris 5.0.1 (Bitplane) ausgewertet wurden. Dabei wurden alle Spines entlang von Dendriten im Programm markiert und anhand der automatisch ermittelten Parameter Spinelänge (L_{Spine}), Breite des Spinekopfes (W_{Kopf}) und Breite des Spinehalses (W_{Hals})

nach den folgenden Regeln, basierend auf die qualitativen Beschreibungen von Peters und Kaiserman-Abramof (1970) und Harris et al. (1992) in drei Klassen eingeteilt: *Mushroom*-Spines: $(\text{maximaler } W_{\text{Kopf}})/(\text{minimaler } W_{\text{Hals}}) > 1,4$ und $(\text{maximaler } W_{\text{Hals}}) > 0,5 \mu\text{m}$ und $(\text{minimaler } W_{\text{Hals}}) > 0 \mu\text{m}$; *stubby*-Spines: $(L_{\text{Spine}})/(\text{mittlerer } W_{\text{Hals}}) < 3$ oder $(\text{minimaler } W_{\text{Hals}}) = 0 \mu\text{m}$ oder $(\text{minimaler } W_{\text{Hals}}) > 0,5 \mu\text{m}$; *thin*-Spines: $(L_{\text{Spine}})/(\text{mittlerer } W_{\text{Hals}}) > 3$. *Thin* Spines besitzen relativ zu ihrem Hals und ihrer Länge einen kleinen Kopf, während *mushroom* Spines einen voluminösen Kopf auf einem sehr dünnen Hals tragen und *stubby* Spines (ohne Hals) durch eine ähnliche Breite wie Länge charakterisiert sind.

4.4.3 Bestimmung der Kollokalisierung von Synapsen- und Rezeptorenbestandteilen in virus-markierten Dendriten

Die Bestimmung der Dichte von kleinsten Strukturen (Synapsen- und Rezeptorenbestandteile) wurde an dekonvolierten dreidimensionalen Bildstapeln (AutoQuantX2, Media Cybernetics) durchgeführt, um den Kontrast und das Signal-Rausch-Verhältnis zu verbessern (Holmes, 1988). Zur Quantifizierung von Synapsen- und Rezeptorenbestandteilen auf lentiviral-markierten apikalen Dendriten von adult-geborenen Neuronen wurden selbstgeschriebene Programme in IgorPro (Wavemetrics) verwendet, die die Kollokalisierung beider Strukturen erfassten (Abbildung 4.10). Dabei wurden für den Nachweis der kleinsten Strukturen Detektionsschwellenwerte festgesetzt. Die Schwellenwertsbestimmung erfolgte mittels Laplace Operator (Dorostkar et al., 2010; für Rezeptoren) bzw. durch einen Schwellenwert, der 20% der maximalen Intensität beträgt (für Synapsen). In beiden Fällen wurden die Punkte, in denen die eGFP (Dendrit) und Alexa 647 (Synapse/Rezeptor) Fluoreszenz überlappten, automatisch erfasst.

4.4.4 Rekonstruktion und Analyse der dendritischen Morphologie

Für die morphologische Auswertung von adult-geborenen Neuronen wurden die dendritischen Bäume aus großen, dreidimensionalen Bildstapeln mit Neurolucida (MicrobrightField) rekonstruiert (Mizrahi, 2007). Während periglomeruläre Nervenzellen aus *in vivo* zwei-photonen-mikroskopischen Aufnahmen nachgezeichnet wurden, erfolgte die Rekonstruktion von Körnerzellen in konfokalen Bildstapeln. Unter den Körnerzellen wurden nur oberflächlich gelegene Zellen ausgewertet, da diese eine kleinere Größe aufweisen, während die tiefer gelegenen Neurone oftmals mehrere 100 μm lange basale Dendriten besitzen. Als wichtigste Parameter wurden die gesamte Dendritenlänge, die distale apikale Dendritenlänge, der Verzweigungsindex und der Somadurchmesser bestimmt.

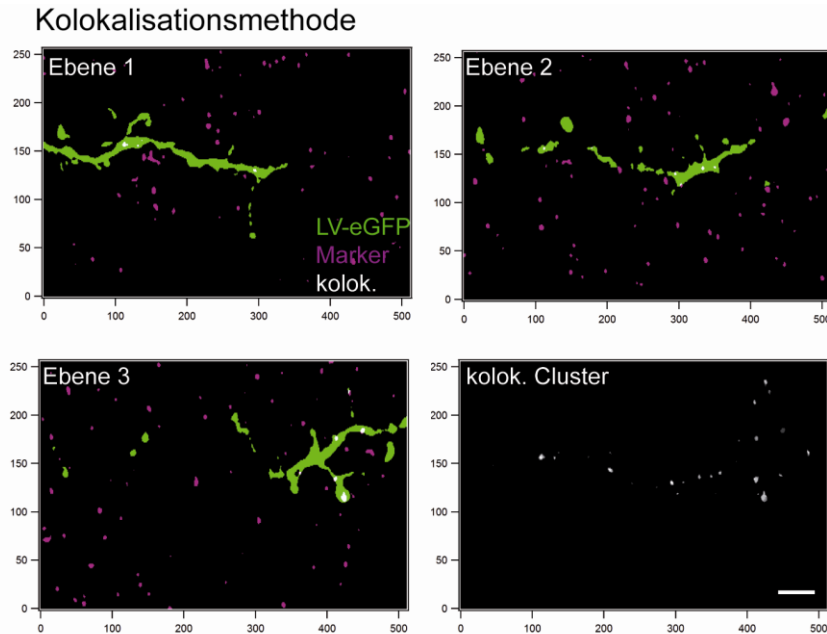


Abbildung 4.10: Kolokalisationsmethode zur quantitativen Analyse von synaptischen Komponenten innerhalb von apikalen Körnerzeldendriten. Kolokalisationsmethode zur Bestimmung der Anzahl an Markerkomponenten (magenta) auf virus-markierten Dendriten (grün) mittels Schwellenwerten in IgorPro: einzelne Ebenen zeigen individuelle Kolokalisationspunkte von Marker und Dendrit, welche in Form von Clustern quantifiziert wurden (weiß). Maßstab - 5 μm .

4.4.5 Volumenmessung zur Quantifizierung von Gliose

Zur Quantifizierung der post-operativen Gliose wurden *in vivo* zwei-photonen-mikroskopische Aufnahmen von Mikroglia (Bildgröße: 421x421x78 μm ; Auflösung: 0,4 μm /Pixel; Einzelbildabstand: 3 μm) über drei verschiedene Zeitpunkte analysiert (14, 24 und 34 Tage). Dazu wurden die einzelnen Mikroglia mit der Software Imaris 5.0.1 (Bitplane) rekonstruiert und nach ihrem Volumen (μm^3) ausgewertet (Abbildung 4.4).

4.4.6 Bildverarbeitung

Für die Darstellung von Abbildungen wurden Bilddateien dekonvolviert (AutoQuantX2, Media Cybernetics), mit dem Ziel den Kontrast zu verbessern, das Hintergrundsignal zu reduzieren und die Kanten von Detailelementen zu schärfen (Holmes, 1988). Mit Photoshop (Adobe) wurden die Einzelbilder auf ihre Größe zugeschnitten, vereinzelt die Signale störender Dendriten oder Blutgefäße entfernt und die Bilder zum Teil invertiert.

4.4.7 Statistische Auswertungen

Statistische Signifikanzen wurden mittels Prism6 (GraphPad) berechnet. Für den Vergleich von zwei Gruppen zu einem Zeitpunkt wurde der Studentsche *t*-Test verwendet, für den Vergleich mehrerer Gruppen zu einem Zeitpunkt die einfaktorielle Varianzanalyse mit nachfolgendem Tukey-Kramer post-hoc Test. Um die Parameter

zweier Gruppen über mehrere Zeitpunkte zu vergleichen, wurde die zweifaktorielle Varianzanalyse mit anschließendem Bonferroni post-hoc Test der Einzelwerte durchgeführt. Die statistische Bewertung von Veränderungen eines Parameters über die Zeit innerhalb einer Gruppe erfolgte mittels einfaktorieller Varianzanalyse mit nachfolgendem Tukey-Kramer post-hoc Test. Alle Daten sind als Mittelwerte angegeben, wobei die Fehlerbalken den Standardfehler des Mittels (SEM) darstellen. In seltenen, gekennzeichneten Fällen ist die Standardabweichung (SD) angegeben. Unterschiede wurden als signifikant erachtet, wenn der P-Wert kleiner als 0,05 war (** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$).

4.5 Labormaterialien und Lösungen

Tabelle 4.2: Standard-Labormaterialien und Lösungen.

Material	Firma
ACSF Schneiden pH 7,4	
- Saccharose (75 mM)	
- NaCl (85 mM)	
- KCl (2,5 mM)	
- NaH_2PO_4 (1,25 mM)	
- NaHCO_3 (25 mM)	
- CaCl_2 (0,5 mM)	
- MgCl_2 (4 mM)	
- Glukose (25 mM)	
ACSF Messung	
- NaCl (125 mM)	
- KCl (2,5 mM)	
- NaH_2PO_4 (1,25 mM)	
- NaHCO_3 (25 mM)	
- CaCl_2 (2 mM)	
- MgCl_2 (2 mM)	
- Glukose (25 mM)	
Agar	Roth
Agarose	Serva
Ampicillin	Merck
D-AP5	Sigma
Biopsiestanze	Miltex
Bohrspitzen	Miltex
BSA	Sigma
Bromphenolblau	Merck
Deckgläschen (Kraniotomie)	VWR
Deckgläschen (Objektträger)	Carl Zeiss
DNA-Ladepuffer	Sigma
DNA-Standard	
- 100 bp-Leiter	Peqlab
- 1 kb-Leiter	New England Biolabs
Dithioerythrit (DTE)	Roth
Einwegpipetten (5/10/25 ml)	Greiner bio-one
Einwegpipetten (1 ml)	VWR
EGTA	Sigma
Ethanol	Roth

4 Materialien und Methoden

Ethidiumbromid	Roth
Falcontubes (15/50 ml)	Greiner bio-one
Flügelkanüle	Hospira venisystem
Gelfoam	Pfizer
Glukose	Sigma
Glycin	Roth
Glycerol	Merck
HBSS	Gibco
Hefeextrakt	Roth
HEPES	Sigma
Immersionsöl	Carl Zeiss
Inzidin	Ecolab
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Kalziumchlorid	Merck
Kanülen (27G/20G)	Terumo
K-Methylsulfat	Sigma
K-Methylsulfat-basierende Lösung pH 7,3	
- $\text{KCH}_3\text{O}_3\text{S}$ (140 mM)	
- KCl (10 mM)	
- NaCl (5 mM)	
- MgATP (2 mM)	
- EGTA (0,01 mM)	
- HEPES (10 mM)	
Kynureinsäure	Sigma
LB-Agarplatten	
- Agar	
- In LB-Medium (15 g/l)	
LB-Medium	
- Trypton (10 g/l)	
- Hefeextrakt (5 g/l)	
- Natriumchlorid (85 mM)	
Magnesiumchlorid	Merck
Magnesium ATP	Sigma
Natriumchlorid	Merck
Natriumhydrogenphosphat	Merck
Natriumhydrogencarbonat	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma
Objektträger	ThermoScientific
PFA	Roth
Pasteurpipetten	Hartenstein
PBS (steril)	Pan Biotech
PBS (10x)	
- Natriumchlorid (1,4 M)	
- Kaliumchlorid (27 mM)	
- Natriumhydrogenphosphat (10 mM)	
- Kaliumdihydrogenphosphat (18 mM)	
Picrotoxin	Sigma
Poly-L-Lysin	Sigma
Proteinase K	Peqlab
Proteinmarker	Invitrogen
Rasierklingen	Rotbart
Reaktionsgefäße	Eppendorf
RNase	Peqlab

Saccharose	Roth
Salzsäure	Roth
Schraubeppendorfgefäße (1,5 ml)	Sarsted
SDS-Gel Laufpuffer (10x)	
- Tris (25 mM)	
- Glycin (1,9 M)	
- SDS (35 mM)	
SDS-Gel Ladepuffer (2x)	
- Tris-HCl (120 mM)	
- Glycerol (20%)	
- SDS (4%)	
- DTE (200 mM)	
- Bromphenolblau (0,05%)	
Skalpelle	Swann Morton
Spritzen	Terumo
Sterilfilter	Whatman
Sukrose	Sigma
Sugi Saugtupfer	Kettenbach
Sybr-Gold	Life Technologies
Tetrodotoxin	Biotrend
Tris	Roth
Tris-HCl	Gibco
Triton X-100	Sigma
Trypton	Roth
Wattestäbchen (steril)	Hartmann
Zellkulturflaschen	Nunc
Zellkulturplatten (10/15 cm)	Sigma
Zellkulturplatten (12-well)	Nunc

Literatur

Adam, Y. & Mizrahi, A. Long-term imaging reveals dynamic changes in the neuronal composition of the glomerular layer. *J. Neurosci.* 31, 7967-7973 (2011).

Adler, C.H. Premotor symptoms and early diagnosis of Parkinson's disease. *Int J Neurosci.* 2, 3-8 (2011).

Abeliovich, A. et al. Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron* 25, 239-352 (2000).

Abraham, N.M. et al. Synaptic inhibition in the olfactory bulb accelerates odor discrimination in mice. *Neuron* 65, 399-411 (2010).

Alerte, T.N. et al. Alpha-synuclein aggregation alters tyrosine hydroxylase phosphorylation and immunoreactivity: lessons from viral transduction of knockout mice. *Neurosci. Lett.* 435, 24-29 (2008).

Alonso, M. et al. Olfactory discrimination learning increases the survival of adult-born neurons in the olfactory bulb. *J Neurosci.* 26, 10508-105013 (2006).

Alonso, M. et al. (2008) Turning astrocytes from the rostral migratory stream into neurons: a role for the olfactory sensory organ. *J Neurosci.* 28, 11089-11102 (2008).

Alonso, M. et al. Activation of adult-born neurons facilitates learning and memory. *Nat Neurosci.* 15, 897-904 (2012).

Altman, J. Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science* 135, 1127-1128 (1962).

Altman, J. & Das, G.D. Post-natal origin of microneurons in the rat brain. *Nature* 207, 953-956 (1965).

Altman, J. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J Comp Neurol.* 137, 433-457 (1969).

Alvarez-Buylla, A., García-Verdugo, J.M., Mateo, A.S. & Merchant-Larios, H. Primary neural precursors and intermitotic nuclear migration in the ventricular zone of adult canaries. *J Neurosci.* 18, 1020-1037 (1998).

Alvarez-Buylla, A., García-Verdugo, J.M. & Tramontin, A.D. A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nat Rev Neurosci.* 2, 287-293 (2001).

- Antón, P.S., Granger, R. & Lynch, G. Simulated dendritic spines influence reciprocal synaptic strengths and lateral inhibition in the olfactory bulb. *Brain Res.* 628, 157-165 (1993).
- Armstrong, C.M & Gilly, W.F. Access resistance and space clamp problems associated with whole-cell patch clamping. *Methods Enzymol.* 207, 100-122 (1992).
- Baba, M. et al. Aggregation of alpha-synuclein in Lewy bodies of sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Am. J. Pathol.* 152, 879-884 (1998).
- Batista-Brito, R., Close, J., Machold, R. & Fishell, G. The distinct temporal origins of olfactory bulb interneuron subtypes. *J Neurosci.* 28, 3966-3975 (2008).
- Beach, T.G., Walker, D.G., Sue, L.I., Newell, A., Adler, C.C. & Joyce, J.N. Substantia nigra Marinesco bodies are associated with decreased striatal expression of dopaminergic markers. *J Neuropathol Exp Neurol.* 63, 329-337 (2004).
- Bédard, A. & Parent, A. Evidence of newly generated neurons in the human olfactory bulb. *Brain Res Dev Brain Res* 151, 159-168 (2004).
- Belitz, H.D., Grosch, W. & Schieberle, P. *Lehrbuch der Lebensmittelchemie.* Springer Verlag, Berlin. (2007)
- Bendor, J.T., Logan, T.P. & Edwards, R.H. The function of a-synuclein. *Neuron* 79, 1044-1066 (2013).
- Bergmann, O. et al. The age of olfactory bulb neurons in humans. *Neuron* 74, 634-639 (2012)
- Bergmann, O. & Frisén, J. Neuroscience. Why adults need new brain cells. *Science* 340, 695-696 (2013).
- Beyer, K. Mechanistic aspects of Parkinson's disease: a-synuclein and the biomembrane. *Cell. Biochem. Biophys.* 47, 285-299 (2007).
- Bezard, E., Yue, Z., Kirik, D. & Spillantini, M.G. Animal models of Parkinson's disease: limits and relevance to neuroprotection studies. *Mov Disord.* 28, 61-70 (2013).
- Bhatt, D.H., Zhang, S. & Gan, W.B. Dendritic spine dynamics. *Annu Rev Physiol.* 71, 261-282 (2009)
- Biebl, M., Winner, B. & Winkler, J. Caspase inhibition decreases cell death in regions of adult neurogenesis. *Neuroreport* 16, 1147-1150 (1995).
- Biebl, M., Cooper, C.M., Winkler, J. & Kuhn, H.G. Analysis of neurogenesis and programmed cell death reveals a self-renewing capacity in the adult rat brain. *Neurosci Lett.* 291, 17-20 (2000).

Literatur

Blandini, F. & Armentero, M.T. Animal models of Parkinson's disease. FEBS J. 279, 1156-1166 (2012).

Blocq, P. & Marinesco, G. Sur un cas de tremblement parkinsonien hémiparétique. C R Soc Biol. 5, 105-111 (1893).

Boecker, W., Denk H., Heintz, P.U. & Moch, H. Pathologie. Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH; 4. Auflage (2008).

Bourne, J. & Harris, K.M. Do thin spines learn to be mushroom spines that remember? Curr Opin Neurobiol. 17, 381-386 (2007).

Bovetti, S. et al. Olfactory enrichment influences adult neurogenesis modulating GAD67 and plasticity-related molecules expression in newborn cells of the olfactory bulb. Plos One 4, 1-10 (2009).

Braak, H. et al. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. Neurobiol Aging 24, 197-211 (2003).

Braithwaite, S.P., Stock, J.B. & Mouradian, M.M. α -Synuclein phosphorylation as a therapeutic target in Parkinson's disease. Rev Neurosci. 23, 191-198 (2012).

Breunig, J.J., Silbereis, J., Vaccarino F.M., Sestan, N. & Rakic, P. Notch regulates cell fate and dendrite morphology of newborn neurons in the postnatal dentate gyrus. Proc Natl Acad Sci. 104, 20558-20563 (2007).

Brodoehl, S. et al. Decreased olfactory bulb volume in idiopathic parkinson's disease detected by 3.0-tesla magnetic resonance imaging. Mov Disord (2012).

Brown, J.P. et al. Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis. J. Comp. Neurol. 467, 1-10 (2003).

Brown, D.R. Oligomeric alpha-synuclein and its role in neuronal death. IUBMB Life 62, 334-339 (2010).

Brus, M., Keller, M. & Lévy, F. Temporal features of adult neurogenesis: differences and similarities across mammalian species. Front Neurosci. 7, 135 (2013).

Buck, L. & Axel, R. A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. Cell 65, 175-187 (1991).

Burgold, S. et al. *In vivo* multiphoton imaging reveals gradual growth of newborn amyloid plaques over weeks. Acta Neuropathol. 121, 327-335 (2011).

- Burré, J. et al. Alpha-synuclein promotes SNARE-complex assembly *in vivo* and *in vitro*. *Science* 329, 1663-1667 (2010).
- Bussell, R. & Eliezer, D. (Residual structure and dynamics in Parkinson's disease-associated mutants of alpha-synuclein, *J. Biol. Chem.* 276, 45996-46003 (2001).
- Cabin, D.E. et al. Synaptic vesicle depletion correlates with attenuated synaptic responses to prolonged repetitive stimulation in mice lacking alpha-synuclein. *J Neurosci.* 22, 8797-8807 (2002).
- Calabrese, B., Wilson, M.S., & Halpain, S. Development and regulation of dendritic spine synapses. *Physiology* 21, 38-47 (2006).
- Cameron, H.A., Kaliszewski, C.K. & Greer, C.A. Organization of mitochondria in olfactory bulb granule cell dendritic spines. *Synapse* 8, 107-118 (1991).
- Carlen, M. et al. Functional integration of adult-born neurons. *Curr Biol.* 12, 606-608 (2002).
- Carleton, A., Petreanu, L.T., Lansford, R., Alvarez-Buylla, A. & Lledo, P.M. Becoming a new neuron in the adult olfactory bulb. *Nat Neurosci.* 6, 507-518 (2003).
- Cayre M., Scotto-Lomassese, S., Malaterre, J., Strambi, C. & Strambi, A. Understanding the regulation and function of adult neurogenesis: contribution from an insect model, the house cricket. *Chem Senses* 32, 385-395 (2007).
- Chandra, S. et al. Double-knockout mice for alpha- and beta-synucleins: effect on synaptic functions. *Proc Natl Acad Sci.* 101, 14966-14971 (2004).
- Chandra, S., Gallardo, G., Fernández-Chacón, R., Schlüter, O.M. & Südhof, T.C. Alpha-synuclein cooperates with CSPalpha in preventing neurodegeneration. *Cell* 123, 383-396 (2005).
- Chapouton, P., Jagasia, R. & Bally-Cuif, L. Adult neurogenesis in non-mammalian vertebrates. *Bioessays* 29, 745-757 (2007).
- Chen, W.R., Xiong, W. & Shepherd, G.M. Analysis of relations between NMDA receptors and GABA release at olfactory bulb reciprocal synapses. *Neuron* 25, 625-633 (2000).
- Chiba-Falek, O., Lopez, G.J. & Nussbaum, R.L. Levels of alpha-synuclein mRNA in sporadic Parkinson disease patients. *Mov Disord.* 21, 1703-1708 (2006).
- Chrischilles, E.A., Rubenstein, L.M., Voelker, M.D., Wallace, R.B. & Rodnitzky, R.L. The health burdens of Parkinson's disease. *Mov Disord.* 13, 406-413 (1998).
- Chuang, TT. Neurogenesis in mouse models of Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta.* 1802, 872-880 (2010).

Literatur

Colucci-D'Amato, L., Bonavita, V. & di Porzio, U. The end of the central dogma of neurobiology: stem cells and neurogenesis in adult CNS. *Neurol Sci.* 27, 266-270 (2006).

Conway, K.A. et al. Acceleration of oligomerization, not fibrillization, is a shared property of both alpha-synuclein mutations linked to early-onset Parkinson's disease: implications for pathogenesis and therapy. *Proc Natl Acad Sci* 97, 571-576 (2000).

Conway, K.A., Rochet, J.C., Bieganski, R.M. & Lansbury, P.T. Jr. Kinetic stabilization of the alpha-synuclein protofibril by a dopamine-alpha-synuclein adduct. *Science* 294, 1346-1349 (2001).

Cookson, M.R. & van der Brug, M. Cell systems and the toxic mechanism(s) of alpha-synuclein. *Exp Neurol.* 209, 5-11 (2008).

Cookson, M.R. Alpha-Synuclein and neuronal cell death. *Mol Neurodegener.* 4, 4-9 (2009).

Cooper, A.A. et al. Alpha-synuclein blocks ER-Golgi traffic and Rab1 rescues neuron loss in Parkinson's models. *Science* 313, 324-328 (2006).

Corti, O., Lesage, S. & Brice, A. What genetics tells us about the causes and mechanisms of Parkinson's disease. *Physiol Rev.* 91, 1161-1218 (2011).

Crews, L. et al. Alpha-synuclein alters Notch-1 expression and neurogenesis in mouse embryonic stem cells and in the hippocampus of transgenic mice. *J Neurosci.* 28, 4250-4260 (2008).

Cronin, J., Zhang, X.Y. & Reiser, J. Altering the tropism of lentiviral vectors through pseudotyping. *Curr Gene Ther.* 5, 387-398 (2005).

Curtis, M.A. et al. Human neuroblasts migrate to the olfactory bulb via a lateral ventricular extension. *Science* 315, 1243-1249 (2007).

Dailey, M. E. & Smith S. J. The dynamics of dendritic structure in developing hippocampal slices. *J Neurosci.* 16, 2983-2994 (1996).

Darios, F. et al. Alpha-synuclein sequesters arachidonic acid to modulate SNARE-mediated exocytosis. *EMBO Rep.* 11, 528-533 (2010).

Dawson, T.M., Ko, H.S. & Dawson, V.L. (2010) Genetic animal models of Parkinson's disease. *Neuron* 66, 646-661 (2010).

Del Tredici, K. & Jost, W.H. Gastrointestinal dysfunction in idiopathic Parkinson's disease. *Nervenarzt* 83, 1282-1291 (2012).

Denk, W., Strickler, J.H. & Webb, W.W. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* 248, 73-76 (1990).

- Denk, W. & Svoboda, K. Photon upmanship: why multiphoton imaging is more than a gimmick. *Neuron* 18, 351-357 (1997).
- Ding, T.T., Lee, S.J., Rochet, J.C. & Lansbury, P.T. Jr. Annular alphasynuclein protofibrils are produced when spherical protofibrils are incubated in solution or bound to brain-derived membranes. *Biochemistry* 41, 10209-10217 (2002).
- Dittgen, T. et al. Lentivirus-based genetic manipulations of cortical neurons and their optical and electrophysiological monitoring *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci.* 101, 18206-18211 (2004).
- Doetsch F., Caillé, I., Lim, D.A., García-Verdugo, J.M. & Alvarez-Buylla, A. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97, 703-716 (1999).
- Dombeck, D.A., Khabbaz, A.N., Collman, F., Adelman, T.L. & Tank, D.W. Imaging large-scale neural activity with cellular resolution in awake, mobile mice. *Neuron* 56, 43-57 (2007).
- Dorostkar, M., Dreosti, E., Odermatt, B. & Lagnado, L. Computational processing of optical measurements of neuronal and synaptic activity in networks. *J Neurosci Methods* 188,141-150 (2010).
- Doty, R.L., Deems, D.A. & Stellar, S. Olfactory dysfunction in parkinsonism: a general deficit unrelated to neurologic signs, disease stage, or disease duration. *Neurology* 38, 1237-1244 (1988).
- Doty, R.L., Riklan, M., Deems, D.A., Reynolds, C. & Stellar, S. The olfactory and cognitive deficits of Parkinson's disease: evidence for independence. *Ann Neurol.* 25, 166-171 (1989).
- Doty, R.L. Olfaction in Parkinson's disease and related disorders. *Neurobiol Dis.* 46, 527-552 (2012).
- Drew, P.J. et al. (2010) Chronic optical access through a polished and reinforced thinned skull. *Nat Methods* 7, 981-984 (2010).
- Duffy, P.O. & Tennyson, V.M. Phase and electron microscopic observations of Lewy bodies and melanin granules in the substantia nigra and locus coeruleus in Parkinson's disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 24, 398-414 (1965).
- Dull, T. et al. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol.* 72, 8463-8471 (1998).
- Duman, R.S. & Li, N. A neurotrophic hypothesis of depression: role of synaptogenesis in the actions of NMDA receptor antagonists. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 367, 2475-2484 (2012).

Literatur

Ehret, R. et al. Direct costs for Parkinson's treatment in private neurology practices in Berlin. *Der Nervenarzt*. 80, 452-458 (2009).

Eisch, A.J. & Petrik, D. Depression and hippocampal neurogenesis: a road to remission? *Science* 338, 72-75 (2012).

Ekdahl, C.T., Kokaia, Z. & Lindvall, O. Brain inflammation and adult neurogenesis: the dual role of microglia. *Neuroscience* 158, 1021-1029 (2009).

Ekdahl, C.T. Microglial activation - tuning and pruning adult neurogenesis. *Front Pharmacol*. 3, 41 (2012).

Enwere, E. et al. Aging results in reduced epidermal growth factor receptor signaling, diminished olfactory neurogenesis, and deficits in fine olfactory discrimination. *J. Neurosci*. 24, 8354-8365 (2004).

Eriksson, P.S. et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 4, 1313-1317(1998).

Espinosa, F. & Kavalali, E.T. NMDA receptor activation by spontaneous glutamatergic neurotransmission. *J Neurophysiol*. 101, 2290-2296 (2009).

Fagerqvist, T. et al. Monoclonal antibodies selective for α -synuclein oligomers/protofibrils recognize brain pathology in Lewy body disorders and α -synuclein transgenic mice with the disease-causing A30P mutation. *J Neurochem*. 126, 131-144 (2013).

Farrer, M.J. Genetics of Parkinson disease: paradigm shifts and future prospects. *Nat Rev Genetics* 7, 306-318 (2006).

Feng, G. Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP. *Neuron* 28, 41-51 (2000).

Fernández-Chacón, R. et al. The synaptic vesicle protein CSP alpha prevents presynaptic degeneration. *Neuron* 42, 237-251 (2004).

Fink, A.L. The aggregation and fibrillation of alpha-synuclein. *Acc. Chem. Res.* 39, 628-634 (2006).

Fleming, S.M. et al. Olfactory deficits in mice overexpressing human wildtype alpha-synuclein. *Eur J Neurosci*. 28, 247-256 (2008).

Foltynie, T. & Kahan, J. Parkinson's disease: an update on pathogenesis and treatment. *J Neurol*. 260, 1433-1440 (2013).

- Forman, M.S., Trojanowski, J.Q. & Lee, V.M. Neurodegenerative diseases: a decade of discoveries paves the way for therapeutic breakthroughs. *Nat. Med.*, 10, 1055-1063 (2004).
- Forster, E. & Lewy, F.H. "Paralysis agitans". In *Pathologische Anatomie. Handbuch der Neurologie* (edited by M. Lewandowsky). Berlin: Springer Verlag, 920-933 (1912).
- Fortin, D.L., Troyer, M.D., Nakamura, K., Kubo, S., Anthony, M.D. & Edwards, R.H. Lipid rafts mediate the synaptic localization of alpha-synuclein. *J Neurosci.* 24, 6715-6723 (2004).
- Fraga, C.G. Plant Polyphenols: How to Translate their *in vitro* Antioxidant Actions to *in vivo* Conditions. *Life*, 59, 308-315 (2007).
- Friedman, A. & Galazka-Friedman, J. The current state of free radicals in Parkinson's disease. Nigral iron as a trigger of oxidative stress. *Adv. Neurol.*, 86, 137-142 (2001).
- Fuhrmann, M., Mitteregger, G., Kretzschmar, H. & Herms, J. Dendritic Pathology in Prion Disease Starts at the Synaptic Spine. *J. Neurosci.* 27, 6224-6233 (2007).
- Gage, F.H. Brain, repair yourself. *Sci Am.* 289, 46-53 (2003).
- Gai, W.P., Power, J.H., Blumbergs, P.C., Culvenor, J.G. & Jensen, P.H. Alpha-synuclein immunolocalization of glial inclusions from multiple system atrophy brain tissue reveals multiprotein components. *J. Neurochem.* 73, 2093-2100 (1999).
- Garaschuk, O., Milos, R.I. & Konnerth, A. Targeted bulk-loading of fluorescent indicators for two-photon brain imaging *in vivo*. *Nat Protoc.* 1, 380-386 (2006).
- Garcia-Reitböck, P. et al. SNARE protein redistribution and synaptic failure in a transgenic mouse model of Parkinson's disease. *Brain* 133, 2032-2044 (2010).
- George, J.M., Jin, H., Woods, W.S. & Clayton, D.F. Characterization of a novel protein regulated during the critical period for song learning in the zebra finch. *Neuron* 15, 361-372 (1995).
- George, S., Rey, N.L., Reichenbach, N., Steiner, J.A. & Brundin, P. α -Synuclein: the long distance runner. *Brain Pathol.* 23, 350-357 (2013).
- Glasl, L. et al. Pink1-deficiency in mice impairs gait, olfaction and serotonergic innervation of the olfactory bulb. *Exp Neurol.* 235, 214-227 (2012).
- Global Parkinson's Disease Survey Steering Committee. Factors impacting on quality of life in Parkinson's disease: results from an international survey. *Mov Disord.* 17, 60-67 (2002).
- Goldman, S.A. & Nottebohm, F. Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. *Proc Natl Acad Sci.* 80, 2390-2394 (1983).

- Goldman, S.A. Adult neurogenesis: from canaries to the clinic. *J Neurobiol.* 36, 267-286 (1998).
- Gonçalves, S. & Outeiro, T.F. Assessing the subcellular dynamics of alpha-synuclein using photoactivation microscopy. *Mol Neurobiol.* 47, 1081-1092 (2013).
- Gould, E., Tanapat, P., McEwen, B.S., Flügge, G. & Fuchs, E. Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. *Proc Natl Acad Sci.* 95, 3168-3171 (1998).
- Gowers, W.R. *A Manual of Diseases of the Nervous System*, Vol 1, London, J & A Churchill (1886).
- Gratzner, H.G. Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. *Science* 218, 474-475 (1982).
- Greten-Harrison, B. et al abc-Synuclein triple knockout mice reveal age-dependent neuronal dysfunction. *Proc Natl Acad Sci.* 107, 19573-19578 (2010).
- Gustavsson, A. et al. Cost of disorders of the brain in Europe 2010. *Eur Neuropsychopharmacol.* 21, 718-779 (2011).
- Hack, M.A. et al. Neuronal fate determinants of adult olfactory bulb neurogenesis. *Nature Neuroscience* 8, 865-872 (2005).
- Haehner, A., Hummel, T. & Reichmann, H. Olfactory loss in Parkinson's disease. *Parkinsons Dis.* 2011, 450939 (2011).
- Harris, K.M., Jensen, F.E. & Tsao, B. Three-dimensional structure of dendritic spines and synapses in rat hippocampus (CA1) at postnatal day 15 and adult ages: implications for the maturation of synaptic physiology and long-term potentiation. *J Neurosci.* 12, 2685-2705 (1992).
- Harris, K. M. & Weinberg, R. J. Ultrastructure of synapses in the mammalian brain. In: *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4.5, a005587 (2012).
- Häusser, M. & Clark, B.A. Tonic synaptic inhibition modulates neuronal output pattern and spatiotemporal synaptic integration. *Neuron* 19, 665-678 (1997).
- Hering, H. & Sheng, M. Dendritic spines: structure, dynamics and regulation. *Nat Rev Neurosci.* 12, 880-888 (2001).
- Höglinger, G.U. et al. Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease. *Nat Neurosci* 7, 726-735 (2004).
- Holmes, T.J. Signal-processing characteristics of differential-interference-contrast microscopy. 2: Noise considerations in signal recovery. *Appl Opt.* 27, 1302-1309 (1998).

- Holtmaat, A. et al. Long-term, high-resolution imaging in the mouse neocortex through a chronic cranial window. *Nat Protoc.* 4, 1128-1144 (2009).
- Hotulainen, P. & Hoogenraad, C.C. Actin in dendritic spines: connecting dynamics to function. *J Cell Biol.* 189, 619-629 (2010).
- Hu, G., Bidel, S., Jousilahti, P., Antikainen, R., & Tuomilehto, J. Coffee and tea consumption and the risk of Parkinson's disease. *Mov Disord.* 22, 2242-2248 (2007).
- Huisman, E., Uylings, H.B.M. & Hoogland, P.V. A 100 % increase of dopaminergic cells in the olfactory bulb may explain hyposmia in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 19, 687-692 (2004).
- Hüls, S et al. AMPA-receptor-mediated excitatory synaptic transmission is enhanced by iron-induced α -synuclein oligomers. *J Neurochem.* 117, 868-878 (2011).
- Huynh, T. The Parkinson's disease market. *Nat Rev Drug Discov.* 10, 571-572 (2011).
- Ingham, C.A., Hood, S.H. & Arbuthnott, G.W. Spine density on neostriatal neurones changes with 6-hydroxydopamine lesions and with age. *Brain Res.* 503, 334-338 (1989).
- Iwakura, Y. et al. Influences of dopaminergic lesion on epidermal growth factor-ErbB signals in Parkinson's disease and its model: neurotrophic implication in nigrostriatal neurons. *J Neurochem.* 93, 974-983 (2005).
- Jankovic, J. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 79, 368-376 (2008).
- Jankovic, J. & Poewe, W. Therapies in Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol.* 25, 433-447 (2012).
- Jellinger, K.A. Interaction between pathogenic proteins in neurodegenerative disorders. *J Cell Mol Med.* 16, 1166-1183 (2012).
- Jensen, P. H., Nielsen, M.S., Jakes, R., Dotti, C.G. & Goedert, M. Binding of α -synuclein to brain vesicles is abolished by familial Parkinson's disease mutation. *J. Biol. Chem.* 273, 26292-26294 (1998).
- Jha, S., Dong, B. & Sakata, K. Enriched environment treatment reverses depression-like behavior and restores reduced hippocampal neurogenesis and protein levels of brain-derived neurotrophic factor in mice lacking its expression through promoter IV. *Transl Psychiatry.* 13,1-40 (2011).
- Jun, H., Mohammed Qasim Hussaini, S., Rigby, M.J. & Jang, M.H. Functional role of adult hippocampal neurogenesis as a therapeutic strategy for mental disorders. *Neural Plast.* 2012, 854285 (2012).

Literatur

Jung, C.K., Fuhrmann, M., Honarnejad, K., Van Leuven, F. & Herms, J. Role of presenilin 1 in structural plasticity of cortical dendritic spines *in vivo*. *J Neurochem.* 119, 1064-1073 (2011).

Jung, S. et al. Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Mol Cell Biol.* 20, 4106-4114 (2000).

Kahle, P.J. et al. Subcellular localization of wild-type and Parkinson's disease-associated mutant alpha synuclein in human and transgenic mouse brain. *J Neurosci.* 20, 6365-6373 (2000).

Kanaan, N.M., Kordower, J.H. & Collier, T.J. Age-related accumulation of Marinesco bodies and lipofuscin in rhesus monkey midbrain dopamine neurons: Relevance to selective neuronal vulnerability. *J Comp Neurol.* 503, 592 (2007).

Kaplan, M.S. & Hinds, J.W. Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science* 197, 1092-1094 (1977).

Kaplan, M.S. Formation and turnover of neurons in young and senescent animals: an electronmicroscopic and morphometric analysis. *Ann N Y Acad Sci.* 457, 173-192 (1985).

Katagiri, H. et al. Dynamic development of the first synapse impinging on adult-born neurons in the olfactory bulb circuit. *Neural Syst Circuits* 1, 6 (2011).

Kato, H.K., Gillet, S.N., Peters, A.J., Isaacson, J.S. & Komiyama, T. Parvalbumin-expressing interneurons linearly control olfactory bulb output. *Neuron* 80, 1218-1231 (2013).

Kelsch, W., Lin, C.W., Mosley, C.P. & Lois, C. A critical period for activity-dependent synaptic development during olfactory bulb adult neurogenesis. *J Neurosci.* 29, 11852-11858 (2009).

Kempermann, G., Kuhn, H.G. & Gage, F.H. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature.* 386, 493-495 (1997).

Kheirbek, M.A., Klemenhagen, K.C., Sahay, A. & Hen, R. Neurogenesis and generalization: a new approach to stratify and treat anxiety disorders. *Nat Neurosci.* 15, 1613-1620 (2012).

Kohl, Z. et al. Fluoxetine rescues impaired hippocampal neurogenesis in a transgenic A53T synuclein mouse model. *Eur J Neurosci.* 35, 10-19 (2012).

Kollias, G., Spanopoulou, E., Grosveld, F., Ritter, M., Beech, J. & Morris, R. Differential regulation of a Thy-1 gene in transgenic mice. *Proc Natl. Acad Sci.* 84, 1492-1496 (1987).

Kontopoulos, E., Parvin, J.D. & Feany, M.B. Alpha-synuclein acts in the nucleus to inhibit histone acetylation and promote neurotoxicity. *Hum Mol Genet.* 15, 3012-3023 (2006).

Kopec, C. & Malinow, R. Neuroscience. Matters of size. *Science* 314, 1554-1555 (2006)

- Kopel, H., Schechtman, E., Groysman, M. & Mizrahi, A. Enhanced synaptic integration of adult-born neurons in the olfactory bulb of lactating mothers. *J Neurosci.* 32, 7519-7527 (2012).
- Kordower, J.H., Chu, Y., Hauser, R.A., Freeman, T.B. & Olanow, C.W. Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease. *Nat Med* 14, 504-506 (2008).
- Kosaka, K. et al. Chemically defined neuron groups and their subpopulations in the glomerular layer of the rat main olfactory bulb. *Neurosci Res.* 23, 73-88 (1995).
- Kosaka, K., Toida, K., Aika, Y. & Kosaka, T. How simple is the organization of the olfactory glomerulus?: the heterogeneity of so-called periglomerular cells. *Neurosci Res.* 30, 101-110 (1998).
- Kosaka, K. & Kosaka, T. Chemical properties of type 1 and type 2 periglomerular cells in the mouse olfactory bulb are different from those in the rat olfactory bulb. *Brain Res.* 1167, 42-55 (2007).
- Kosaka, K. & Kosaka, T. Secretagogin-containing neurons in the mouse main olfactory bulb. *Neurosci Res.* (2013). [Epub ahead of print]
- Kramer, M.L. & Schulz-Schaeffer, W.J. Presynaptic alpha-synuclein aggregates, not Lewy bodies, cause neurodegeneration in dementia with Lewy bodies. *J Neurosci.* 27, 1405-1410 (2007).
- Krüger, R. et al. Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet.* 18, 106-108 (1998).
- LaFerla, F.M. & Green, K.N. Animal models of Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2, 1-13 (2012)
- Larsson, M. et al. Age-related loss of olfactory sensitivity: association to dopamine transporter binding in putamen. *Neuroscience* 161, 422-426 (2009).
- Laurent, G. Olfactory network dynamics and the coding of multidimensional signals. *Nat Rev Neurosci.* 3, 884-395 (2002).
- Lazarini, F. & Lledo, P.M. Is adult neurogenesis essential for olfaction? *Trends Neurosci.* 34, 20-30 (2011).
- Lazarini, F., Gabellec, M.M., Torquet, N. & Lledo, P.M. Early activation of microglia triggers long-lasting impairment of adult neurogenesis in the olfactory bulb. *J Neurosci.* 32, 3652-3664 (2012).
- Lee, F.J. et al. Direct binding and functional coupling of alpha-synuclein to the dopamine transporters accelerate dopamine-induced apoptosis. *FASEB J.* 15, 916-926 (2001).

Literatur

Lee, J.C, Langen, R., Hummel, P.A., Gray, H.B & Winkler, J.R. Alpha-synuclein structures from fluorescence energy-transfer kinetics: implications for the role of the protein in Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 16466-16471 (2004).

Lee, W.C. et al. A dynamic zone defines interneuron remodeling in the adult neocortex. *Proc Natl Acad Sci.* 105, 19968-19973 (2008).

Lelan, F. et al. Effects of Human Alpha-Synuclein A53T-A30P Mutations on SVZ and Local Olfactory Bulb Cell Proliferation in a Transgenic Rat Model of Parkinson Disease. *Parkinsons Dis.* (2011).

Lemasson, M., Saghatelian, A., Olivo-Marin, J.C. & Lledo, P.M. Neonatal and adult neurogenesis provide two distinct populations of newborn neurons to the mouse olfactory bulb. *J Neurosci.* 25, 6816-6825 (2005).

Lenington, J.B. et al. Midbrain dopamine neurons associated with reward processing innervate the neurogenic subventricular zone. *J Neurosci.* 31, 13078-13087 (2011).

Lepousez, G., Valley, M.T. & Lledo, P.M. The impact of adult neurogenesis on olfactory bulb circuits and computations. *Annu Rev Physiol.* 75, 339-363 (2013).

Leuba, G. Aging of dendrites in the cerebral cortex of the mouse. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 9, 467-475 (1983).

Li, Z., Okamoto, K., Hayashi, Y. & Sheng, M. The importance of dendritic mitochondria in the morphogenesis and plasticity of spines and synapses. *Cell* 119, 873-887 (2004).

Liang, G., Ward, C. & Peng, J. Isoflurane causes greater neurodegeneration than an equivalent exposure of sevoflurane in the developing brain of neonatal mice. *Anesthesiology* 112 1325-1334 (2010).

Liberini, P., Parola, S., Spano, P.F., Antonini, L. Olfaction in Parkinson's disease: methods of assessment and clinical relevance. *J Neurol.* 247, 88-96 (2000).

Lim, Y. et al. a-Syn suppression reverses synaptic and memory defects in a mouse model of dementia with Lewy bodies. *J Neurosci.* 31, 10076-10087(2011).

Lindeberg, J. et al. Transgenic expression of Cre recombinase from the tyrosine hydroxylase locus. *Genesis* 40, 67-73 (2004).

Livneh, Y. & Mizrahi, A. Experience-dependent plasticity of mature adult-born neurons. *Nat. Neurosci.* 15, 26-28 (2011).

- Livneh, Y., Feinstein, N., Klein, M. & Mizrahi, A. Sensory input enhances synaptogenesis of adult-born neurons. *J Neurosci.* 29, 86-97 (2009).
- Livneh, Y., Adam, Y. & Mizrahi, A. Odor Processing by Adult-Born Neurons. *Neuron* 81, 1-14 (2014).
- Lledo, P.M., Gheusi, G. & Vincent, J. Information processing in the mammalian olfactory system. *Physiol Rev.* 85, 281-283 (2005).
- Lledo, P.M. & Saghatelian, A. Integrating new neurons into the adult olfactory bulb: joining the network, life-death decisions, and the effects of sensory experience. *Trends Neurosci.* 28, 248-254 (2005).
- Lledo, P.M. & Lagier, S. Adjusting neurophysiological computations in the adult olfactory bulb. *Semin Cell Dev Biol.* 17, 443-453 (2006).
- Lledo, P.M., Alonso, M. & Grubb, M.S. Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nat Rev Neurosci* 7, 179-193 (2006).
- Lledo, P.M., Merkle, F.T. & Alvarez-Buylla, A. Origin and function of olfactory bulb interneuron diversity. *Trends Neurosci.* 31, 392-400 (2008).
- Lois, C. & Alvarez-Buylla, A. Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc Natl Acad Sci* 90, 2074-2077 (1993).
- Lois, C. & Alvarez-Buylla, A. Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* 264, 1145-1148 (1994).
- Lois, C., García-Verdugo, J.M. & Alvarez-Buylla, A. Chain migration of neuronal precursors. *Science* 271, 978-981 (1996).
- Lötsch, J. et al. Functional genomics suggest neurogenesis in the adult human olfactory bulb. *Brain Struct Funct.* (2013) (epub ahead of print).
- Luine, V. & Frankfurt, M. Interactions between estradiol, BDNF and dendritic spines in promoting memory. *Neuroscience* 3;239, 34-45 (2013).
- Lundvig, D., Lindersson, E. & Henning, P. Pathogenic effects of α -synuclein aggregation. *Mol. Brain Res.* 134, 3-17 (2005).
- Luo, M. & Katz, L.C. Response correlation maps of neurons in the mammalian olfactory bulb. *Neuron* 32, 1165-1179 (2001).
- MacKenzie, S.J. & Houslay, M.D. Action of rolipram on specific PDE4 cAMP phosphodiesterase isoforms and on the phosphorylation of cAMP-response-element-binding protein (CREB) and p38

Literatur

mitogen-activated protein (MAP) kinase in U937 monocytic cells. *Biochem J.* 347, 571-578 (2000).

Madisen, L. et al. A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. *Nat Neurosci* 13, 133-140 (2010).

Markram, H., Toledo-Rodriguez, M., Wang, Y., Gupta, A., Silberberg, G. & Wu, C. Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat Rev Neurosci.* 5, 793-807 (2004).

Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A. & Rémésy, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am. J. Clin. Nutr.*, 81, 230-242 (2005).

Mandairon, N., Stack, C., Kiselycznyk, C. & Linster, C. Enrichment to odors improves olfactory discrimination in adult rats. *Behav Neurosci.* 120, 173-179 (2006).

Maroteaux, L., Campanelli, J.T. & Scheller, R.H. Synuclein. A neuronspecific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. *J. Neurosci.* 8, 2804-2815 (1988).

Maroteaux, L. & Scheller, R.H. The rat brain synucleins; family of proteins transiently associated with neuronal membrane. *Brain Res Mol Brain Res.* 11, 335-343 (1991).

Marxreiter, F. et al. Changes in adult olfactory bulb neurogenesis in mice expressing the A30P mutant form of alpha-synuclein. *Eur. J. Neurosci.* 29, 879-890 (2009).

Marxreiter, F., Regensburger, M. & Winkler, J. Adult neurogenesis in Parkinson's disease. *Cell Mol Life Sci.* 70, 459-473 (2013).

Masliah, E. et al. (2000) Dopaminergic loss and inclusion body formation in alpha-synuclein mice: implications for neurodegenerative disorders. *Science* 287, 1265-1269 (2000).

Matsuzaki, M., Ellis-Davies, G.C., Nemoto, T., Miyashita, Y., Iino, M. & Kasai, H. Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Nat Neurosci.* 4, 1086-1092 (2001).

Matsuzaki, M., Honkura, N., Ellis-Davies, G.C.R. & Kasai, H. Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature* 6993, 761-766 (2004).

Matsutani, S. & Yamamoto, N. Postnatal development of dendritic spines on olfactory bulb granule cells in rats. *J Comp Neurol.* 473, 553-561 (2004).

Murphy, D.D., Rueter, S.M., Trojanowski, J.Q. & Lee, V.M. Synucleins are developmentally expressed, and alpha-synuclein regulates the size of the presynaptic vesicular pool in primary hippocampal neurons. *J Neurosci.* 20, 3214-3220 (2000).

- May, V.E. et al. Impaired olfactory bulb neurogenesis depends on the presence of human wild-type alpha-synuclein. *Neuroscience* 222, 343-355 (2012).
- McNaught, K.S. & Jenner, P. Proteasomal function is impaired in substantia nigra in Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.*, 297, 191-194 (2001).
- McNeill, T.H., Brown, S.A., Rafols, J.A. & Shoulson, I. Atrophy of medium spiny I striatal dendrites in advanced Parkinson's disease. *Brain Res.* 455, 148-152 (1988).
- Meissner, W.G. et al. Priorities in Parkinson's disease research. *Nat Rev Drug Discov.* 10, 377-393 (2011).
- Mezey, E., Dehejia, A., Harta, G., Papp, M.I., Polymeropoulos, M.H. & Brownstein, M.J. Alpha synuclein in neurodegenerative disorders: murderer or accomplice? *Nature Med.* 4, 755-757 (1998).
- Mihalick, S.M., Langlois, J.C., Krienke, J.D. & Dube, W.V. An olfactory discrimination procedure for mice. *J Exp Anal Behav.* 73, 305-318 (2000).
- Ming, G.L. & Song, H. Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron* 70, 687-702 (2011).
- Mistrík, P. et al. The murine HCN3 gene encodes a hyperpolarization-activated cation channel with slow kinetics and unique response to cyclic nucleotides. *J Biol Chem.* 280, 27056-27061 (2005).
- Miyamichi, K., Shlomai-Fuchs, Y., Shu, M., Weissbourd, B.C. Luo, L., & Mizrahi, A. Dissecting local circuits: parvalbumin interneurons underlie broad feedback control of olfactory bulb output. *Neuron* 80, 1232-1245 (2013).
- Mizrahi, A. Dendritic development and plasticity of adult-born neurons in the mouse olfactory bulb. *Nat Neurosci.* 10, 444-452 (2007).
- Molinoff, P.B. & Axelrod, J. Biochemistry of catecholamines. *Annu Rev Biochem.* 40, 465-500 (1971).
- Mouret, A., Lepousez, G., Gras, J., Gabelle, M.M. & Lledo, P.M. Turnover of newborn olfactory bulb neurons optimizes olfaction. *J. Neurosci.* 29, 12302-12314 (2009).
- Mu, Y., Lee, S.W. & Gage, F.H. Signaling in adult neurogenesis. *Curr Opin Neurobiol* 20, 416-423 (2010).
- Mundinano, I.C. Increased dopaminergic cells and protein aggregates in the olfactory bulb of patients with neurodegenerative disorders. *Acta Neuropathol.* 122, 61-74 (2011).

Literatur

Nagata, H. High voltage electron microscopic studies on mitral, tufted, and granule cells in the mouse olfactory bulb. *J Electron Microsc.* 38, 111-125 (1989).

Nägerl, U.V., Eberhorn, N., Cambridge, S.B. & Bonhoeffer, T. Bidirectional activity-dependent morphological plasticity in hippocampal neurons. *Neuron* 44, 759-767 (2004).

Nägerl, U.V., Köstinger, G., Anderson, J.C., Martin, K.A. & Bonhoeffer, T. Protracted synaptogenesis after activity-dependent spinogenesis in hippocampal neurons. *J Neurosci.* 27, 8149-8156 (2007).

Nakata, Y. et al. Accumulation of α -synuclein triggered by presynaptic dysfunction. *J Neurosci.* 32, 17186-17196 (2012).

Narayanan, N.S., Rodnitzky, R.L. & Uc, E.Y. Prefrontal dopamine signaling and cognitive symptoms of Parkinson's disease. *Rev Neurosci.* 24, 267-278 (2013).

Nemani, V.M. et al. Increased expression of alpha-synuclein reduces neurotransmitter release by inhibiting synaptic vesicle reclustering after endocytosis. *Neuron* 65, 66-79 (2010).

Neumann, M. et al. Misfolded proteinase K-resistant hyperphosphorylated α -synuclein in aged transgenic mice with locomotor deterioration and in human α -synucleinopathies. *J. Clinical Investigation* 110, 1429-1439 (2002).

Newpher, T.M. & Ehlers, M.D. Spine microdomains for postsynaptic signaling and plasticity. *Trends Cell Biol.* 19, 218-227 (2009).

Nikolaus, S., Antke, C. & Müller, H.W. *In vivo* imaging of synaptic function in the central nervous system: II. Mental and affective disorders. *Behav Brain Res.* 204, 32-66 (2009).

Ninkovic, J., Mori, T. & Götz, M. Distinct modes of neuron addition in adult mouse neurogenesis. *J Neurosci.* 27, 10906-10911 (2007).

Novak, A., Guo, C., Yang, W., Nagy, A. & Lobe, C.G. Z/EG, a double reporter mouse line that expresses enhanced green fluorescent protein upon Cre-mediated excision. *Genesis* 28, 147-155 (2000).

Nuber, S. et al. Neurodegeneration and motor dysfunction in a conditional model of Parkinson's disease. *J Neurosci.* 28, 2471-2484 (2008).

Obeso, J.A. et al. Missing pieces in the Parkinson's disease puzzle. *Nat Med.* 16, 653-661(2010).

Oddo, S. et al. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron* 39, 409-421 (2003).

- O'Keefe, G.C. et al. Dopamine-induced proliferation of adult neural precursor cells in the mammalian subventricular zone is mediated through EGF. *Proc Natl Acad Sci.* 106, 8754-8759 (2009).
- O'Keefe, G.C., Barker, R.A. & Caldwell, M.A. Dopaminergic modulation of neurogenesis in the subventricular zone of the adult brain. *Cell Cycle* 8, 2888-2894 (2009b).
- Olanow, C.W. & Brundin, P. Parkinson's disease and alpha synuclein: is Parkinson's disease a prion-like disorder? *Mov Disord.* 28, 31-40 (2013).
- O'Rourke, N.A., Sullivan, D.P., Kaznowski, C.E., Jacobs, A.A. & McConnell, SK. Tangential migration of neurons in the developing cerebral cortex. *Development* 121, 2165-2176 (1995).
- Ostroff, L.E., Fiala, J.C., Allwardt, B. & Harris, K.M. Polyribosomes redistribute from dendritic shafts into spines with enlarged synapses during LTP in developing rat hippocampal slices. *Neuron* 35, 535-545 (2002).
- Oueslati, A., Schneider, B.L., Aebischer, P. & Lashuel, H.A. Polo-like kinase 2 regulates selective autophagic α -synuclein clearance and suppresses its toxicity *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci.* 110, 3945-3954 (2013).
- Ovsepian, S.V. & Dolly, J.O. Dendritic SNAREs add a new twist to the old neuron theory. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108, 19113-19120 (2011).
- Pagano, S.F. et al. Isolation and characterization of neural stem cells from the adult human olfactory bulb. *Stem Cells* 18, 295-300 (2000).
- Pallotto, M. et al. Early formation of GABAergic synapses governs the development of adult-born neurons in the olfactory bulb. *J Neurosci.* 32, 9103-9115 (2012).
- Panzanelli, P. et al. Early synapse formation in developing interneurons of the adult olfactory bulb. *J Neurosci.* 29, 15039-15052 (2009).
- Pappolla, M.A., Shank, D.L., Alzofon, J. & Dudley, A.W. Colloid (hyaline) inclusion bodies in the central nervous system: their presence in the substantia nigra is diagnostic of Parkinson's disease. *Hum Pathol.* 19, 27-31(1988).
- Parekh, R. & Ascoli, G.A. Neuronal morphology goes digital: a research hub for cellular and system neuroscience. *Neuron* 77, 1017-1038 (2013).
- Parrish-Aungst, S., Shipley, M.T., Erdelyi, F., Szabo, G. & Puche, A.C. Quantitative analysis of neuronal diversity in the mouse olfactory bulb. *J Comp Neurol.* 501, 825-836 (2007).

Literatur

Peters, A. & Kaiserman-Abramof, I.R. The small pyramidal neuron of the rat cerebral cortex. The perikaryon, dendrites and spines. *Am J Anat.* 127, 321-355 (1970).

Petreanu, L. & Alvarez-Buylla, A. Maturation and death of adult-born olfactory bulb granule neurons: Role of olfaction. *J Neurosci* 22, 6106-6113 (2002).

Pittet, M. J. & Weissleder, R. Intravital imaging. *Cell* 5, 983-991 (2011).

Platt, T.L., Reeves, V.L. & Murphy, M.P. Transgenic models of Alzheimer's disease: better utilization of existing models through viral transgenesis. *Biochim Biophys Acta* 1832, 1437-1448 (2013).

Polymeropoulos, M.H. et al. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 276, 2045-2047(1997).

van Praag, H., Kempermann, G. & Gage, F.H. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci.* 2, 266-270 (1999).

Price, J.L. & Powell, T.P. The synaptology of the granule cells of the olfactory bulb. *J Cell Sci.*7, 125-155 (1970).

Raggi, A., Bella, R., Pennisi, G., Neri, W. & Ferri, R. Sleep disorders in Parkinson's disease: a narrative review of the literature. *Rev Neurosci.* 24, 279-291 (2013).

Rall, W., Shepherd, G.M., Reese, T.S. & Brightman, M.W. Dendrodendritic synaptic pathway for inhibition in the olfactory bulb. *Exp Neurol.* 14, 44-56 (1966).

Ramón y Cajal, S. Estructura de los centros nerviosos de las aves. *Rev Trim Histol Patol.* 1, 1-10 (1888).

Ramón y Cajal, S. Degeneration and Regeneration of the Nervous System. London: Oxford University Press (1913).

Ramón y Cajal, S. Degeneration and Regeneration of the Nervous System. Vol. 2 London: Oxford University Press (1928).

Ravina, B. et al. The impact of depressive symptoms in early Parkinson disease. *Neurology* 69, 342-347 (2007).

Rehn, B., Panhuber, H., Laing, D.G. & Breipohl, W. Spine density on olfactory granule cell dendrites is reduced in rats reared in a restricted olfactory environment. *Brain Res.* 468, 143-147 (1988).

Reynolds, B.A. & Weiss, S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255, 1707-1710 (1992).

- Rizo, J. & Südhof, TC. The membrane fusion enigma: SNAREs, Sec1/Munc18 proteins, and their accomplices-guilty as charged? *Annu Rev Cell Dev Biol.* 28, 279-308 (2012).
- Roberts, T.F., Tschida, K.A., Klein, M.E. & Mooney, R. Rapid spine stabilization and synaptic enhancement at the onset of behavioural learning. *Nature* 463, :948-952 (2010).
- Rocheffort, C. et al. Enriched odor exposure increases the number of newborn neurons in the adult olfactory bulb and improves odor memory. *J Neurosci.* 22, 2679-2689 (2002).
- Rockenstein, E., Hansen, L.A., Mallory, M., Trojanowski, J.Q., Galasko, D. & Masliah, E. Altered expression of the synuclein family mRNA in Lewy body and Alzheimer's disease. *Brain Res.* 914, 48-56 (2001).
- Rosselli-Austin, L. & Williams, J. Enriched neonatal odor exposure leads to increased numbers of olfactory bulb mitral and granule cells. *Brain Res Dev Brain Res.* 51, 135-137 (1990).
- Rotheneichner, P., Marschallinger, J., Couillard-Despres, S., Aigner, L. Neurogenesis and neuronal regeneration in status epilepticus. *Epilepsia* 6, 40-42 (2013).
- Rubinsztein, D.C. The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature* 443, 780-786 (2006).
- Saghatelyan, A. Activity-dependent adjustments of the inhibitory network in the olfactory bulb following early postnatal deprivation. *Neuron* 46, 103-116 (2005).
- Sakaguchi-Nakashima, A., Meir, J.Y., Jin, Y., Matsumoto, K. & Hisamoto, N. LRK-1, a *C. elegans* PARK8-related kinase, regulates axonal-dendritic polarity of SV proteins. *Curr Biol.* 17, 592-598 (2007).
- Sanai, N., Nguyen, T. & Ihrie, R.A. Corridors of migrating neurons in the human brain and their decline during infancy. *Nature* 478, 382-386 (2011).
- Sato, H., Kat,o T. & Arawaka, S. The role of Ser129 phosphorylation of α -synuclein in neurodegeneration of Parkinson's disease: a review of *in vivo* models. *Rev Neurosci.* 9, 1-9 (2013).
- Sawada, M. Sensory input regulates spatial and subtype-specific patterns of neuronal turnover in the adult olfactory bulb. *J Neurosci.* 31, 11587-11596 (2011).
- Schell, H., Hasegawa, T., Neumann, M. & Kahle, P. Nuclear and neuritic distribution of Serine 129 phosphorylated α -SYN in transgenic mice. *Neuroscience* 160, 796-804 (2009).

Literatur

Schmidt, F., Levin, J., Kamp, F., Kretschmar, H., Giese, A. & Bötzel, K. Single-channel electrophysiology reveals a distinct and uniform pore complex formed by α -synuclein oligomers in lipid membranes. *PLoS One* 7, 42545 (2012).

Segal, M., Vlachos, A. & Korkotian, E. The spine apparatus, synaptopodin, and dendritic spine plasticity. *Neuroscientist* 16, 125-131 (2010).

Selkoe, D.J. Soluble oligomers of the amyloid beta-protein impair synaptic plasticity and behavior. *Behav Brain Res.* 192, 106-113 (2008).

Shaner, N. C., Steinbach, P. A. & Tsien, R.Y. A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat Methods* 12, 905-909 (2005).

Sheng, M., Sabatini, B.L. & Südhof T. C. Synapses and Alzheimer's disease. In: *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4.5 a005777 (2012).

Shepherd, G.M. *The Synaptic Organization of the Brain*. Fifth Edition. New York: Oxford University Press (2004).

Shepherd, G.M., Chen, W.R., Willhite, D., Migliore, M. & Greer, C.A. The olfactory granule cell: from classical enigma to central role in olfactory processing. *Brain Res. Rev.* 55, 373–382 (2007).

Singleton, A.B. et al. α -Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* 302, 841.

Skovronsky, D.M., Lee, V.M. & Trojanowski, J.Q. Neurodegenerative diseases: new concepts of pathogenesis and their therapeutic implications. *Annu. Rev. Pathol.* 1, 151-170 (2006).

Smith, W.W. et al. Endoplasmic reticulum stress and mitochondrial cell death pathways mediate A53T mutant α -synuclein-induced toxicity. *Hum Mol Genet.* 14, 3801-3811 (2005).

Soto, C. Protein misfolding and disease; protein refolding and therapy. *FEBS Lett.* 498, 204-207 (2001).

Soto, C. Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci.* 4, 49-60 (2003).

Sousa, V.L. et al. α -synuclein and its A30P mutant affect actin cytoskeletal structure and dynamics. *Mol Biol Cell* 20, 3725-3739 (2009).

Specht, C.G. & Schoepfer, R. Deletion of the α -synuclein locus in a subpopulation of C57BL/6 J inbred mice. *BMC Neurosci.* 2, 11 (2001).

Spillantini, M.G. et al. α synuclein in Lewy bodies. *Nature* 388, 839-840 (1997).

- Spillantini, M.G., Crowther, R.A., Jakes, R., Hasegawa, M. & Goedert, M. alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci.*, 95, 6469-6473 (1998).
- Springer, W. & Kahle, P.J. Mechanisms and models of alpha-synuclein-related neurodegeneration. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 6, 432-436 (2006).
- Starkstein, S.E., Brockman, S. & Hayhow, B.D. Psychiatric syndromes in Parkinson's disease. *Curr Opin Psychiatry* 25, 468-472 (2012).
- Südhof, T.C. & Rothman, J.E. Membrane fusion: grappling with SNARE and SM proteins. *Science* 323, 474-477 (2009).
- Sultan, S. et al. Learning-dependent neurogenesis in the olfactory bulb determines long-term olfactory memory. *FASEB J* 24, 2355-2363 (2010).
- Sulzer, D. Multiple hit hypotheses for dopamine neuron loss in Parkinson's disease. *Trends Neurosci.* 30, 244-250 (2007).
- Surguchov, A. Synucleins: are they two-edged swords? *J Neurosci Res.* 91, 161-166 (2013).
- Tani, M. et al. Ectopic expression of α -synuclein affects the migration of neural stem cells in mouse subventricular zone. *J Neurochem.* 115, 854-863 (2010).
- Svoboda, K., Denk, W., Kleinfeld, D. & Tank, D.W. *In vivo* dendritic calcium dynamics in neocortical pyramidal neurons. *Nature* 385, 161-165 (1997).
- Svoboda, K. & Yasuda, R. Principles of two-photon excitation microscopy and its applications to neuroscience. *Neuron* 50, 823-839 (2006).
- Takano, T. et al. Cortical spreading depression causes and coincides with tissue hypoxia. *Nat Neurosci.* 10, 754-762 (2007).
- Tepavčević, V. et al. Inflammation-induced subventricular zone dysfunction leads to olfactory deficits in a targeted mouse model of multiple sclerosis. *J Clin Invest.* 121, 4722-4734 (2011).
- Theer, P., Hasan, M.T. & Denk, W. Two-photon imaging to a depth of 1000 μ m in living brains by use of a Ti:Al₂O₃ regenerative amplifier. *In: Optics Letters.* 12, 1022-1024 (2003).
- Tian, L. et al. Imaging neural activity in worms, flies and mice with improved GCaMP calcium indicators. *Nat Methods* 6, 875-881 (2009).
- Tillerson, J.L. et al. Olfactory discrimination deficits in mice lacking the dopamine transporter or the D2 dopamine receptor. *Behav Brain Res.* 172, 97-105 (2006).

Literatur

Tobias, A., Saxena, M. & Lelievre, V. CDK5: the "pathfinder" for new born neurons in adult hippocampus? *Cell Adh Migr.* 3, 319-321 (2009).

Toda, T. Molecular genetics of Parkinson's disease. *Brain Nerve* 59, 815-823 (2007).

Trepel, M. *Neuroanatomie-Struktur und Funktion*. 4. Auflage. Urban & Fischer, 153ff. (2008).

Truini, A., Frontoni, M. & Cruccu, G. Parkinson's disease related pain: a review of recent findings. *J Neurol.* 260, 330-334 (2013).

Tsaneva-Atanasova, K., Burgo, A., Galli, T. & Holcman, D. Quantifying neurite growth mediated by interactions among secretory vesicles, microtubules, and actin networks. *Biophys J.* 96, 840-857 (2009).

Ubeda-Bañon, I. et al. Alpha-Synucleinopathy in the human olfactory system in Parkinson's disease: involvement of calcium-binding protein- and substance P-positive cells. *Acta Neuropathol.* 119, 723-735 (2010).

Vekrellis, K. & Stefanis, L. Targeting intracellular and extracellular alpha-synuclein as a therapeutic strategy in Parkinson's disease and other synucleinopathies. *Expert Opin Ther Targets.* 16, 221-232 (2012).

Veldman, B.A., Wijn, A.M., Knoers, N., Praamstra, P. & Horstink, M.W. Genetic and environmental risk factors in Parkinson's disease. *Clin Neurol Neurosurg.* 100, 15-26 (1998).

Venda, L.L., Cragg, S.J., Buchman, V.L. & Wade-Martins, R. α -Synuclein and dopamine at the crossroads of Parkinson's disease. *Trends Neurosci.* 33, 559-568 (2010).

Villalba, R.M., Lee, H. & Smith, Y. Dopaminergic denervation and spine loss in the striatum of MPTP-treated monkeys. *Exp Neurol.* 215, 220-227 (2009).

Villalba, R.M. & Smith, Y. Striatal spine plasticity in Parkinson's disease. *Front Neuroanat.* 4, 133 (2010).

Vogel, G. Gene discovery offers tentative clues to Parkinson's. *Science* 276, 2045-2047 (1997).

Vukovic, J. et al. Immature doublecortin-positive hippocampal neurons are important for learning but not for remembering. *J Neurosci.* 33, 6603-6613 (2013).

Vutskits, L., Gascon, E. & Tassonyi, E. Effect of ketamine on dendritic arbour development and survival of immature GABAergic neurons in vitro. *Toxicol Sci.* 91, 540-549 (2006).

Wachowiak, M. & Shipley, M.T. Coding and synaptic processing of sensory information in the glomerular layer of the olfactory bulb. *Semin Cell Dev Biol.* 17, 411-423 (2006).

- Wang, Y. et al. Phosphorylated α -synuclein in Parkinson's disease. *Sci Transl Med.* 4, 121 (2012).
- Wagner, J. et al. Anle138b: a novel oligomer modulator for disease-modifying therapy of neurodegenerative diseases such as prion and Parkinson's disease. *Acta Neuropathol.* 125, 795-813 (2013).
- Wakabayashi, K., Yoshimoto, M., Tsuji, S. & Takahashi, H. Alpha-synuclein immunoreactivity in glial cytoplasmic inclusions in multiple system atrophy. *Neurosci. Lett.* 249, 180-182 (1998).
- Wakabayashi, K., Tanji, K., Odagiri, S., Miki, Y., Mori, F. & Takahashi, H. The Lewy body in Parkinson's disease and related neurodegenerative disorders. *Mol Neurobiol.* 47, 495-508 (2013).
- Wallace, D.J. et al. Single-spike detection *in vitro* and *in vivo* with a genetic Ca²⁺ sensor. *Nat Methods* 5, 797-804 (2008).
- Wang, C. et al. Identification and characterization of neuroblasts in the subventricular zone and rostral migratory stream of the adult human brain. *Cell Res.* 21, 1534-1550 (2011).
- Weinreb, P.H., Zhen, W., Conway, P.T., Poon, A.W. & Lansbury, P.T. Jr. NACP, a protein implicated in Alzheimer's disease and learning, is natively unfolded. *Biochemistry* 35, 13709-13715 (1996).
- Whitman, M.C. & Greer, C.A. Synaptic integration of adult-generated olfactory bulb granule cells: basal axodendritic centrifugal input precedes apical dendrodendritic local circuits. *J Neurosci.* 27, 9951-9961 (2007).
- Whitman, M.C. & Greer, C.A. Adult neurogenesis and the olfactory system. *Prog Neurobiol.* 89, 162-175 (2009).
- Winkler, J. et al. (2011) Parkinson's disease risk score: moving to a premotor diagnosis. *J Neurol.* 258, 311-315 (2011).
- Winner, B., Cooper-Kuhn, C.M., Aigner, R., Winkler, J. & Kuhn, H.G. Long-term survival and cell death of newly generated neurons in the adult rat olfactory bulb. *Eur. J. Neurosci.* 16, 1681-1689 (2002).
- Winner, B. et al. Human wild-type alpha-synuclein impairs neurogenesis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 63, 1155-1166 (2004).
- Winner, B. et al. Mutant alpha-synuclein exacerbates age-related decrease of neurogenesis. *Neurobiol Aging* 29, 913-925 (2008).

Literatur

Winner, B. et al. Adult neurogenesis and neurite outgrowth are impaired in LRRK2 G2019S mice. *Neurobiol Dis.* 4, 706-716 (2011).

Winner, B., Kohl, Z. & Gage, F.H. Neurodegenerative disease and adult neurogenesis. *Eur J Neurosci.* 33, 1139-1151 (2011b).

Winner, B. et al. (2012) Role of α -synuclein in adult neurogenesis and neuronal maturation in the dentate gyrus. *J Neurosci.* 32, 16906-16916.

Wood, S.J., Wypych, J., Steavenson, S., Louis, J.C., Citron, M. & Biere, A.L. α -synuclein fibrillogenesis is nucleation-dependent. Implications for the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Biol Chem.* 274, 19509-19512 (1999).

Woolf, T.B., Shepherd, G.M. & Greer, C.A. Serial reconstructions of granule cell spines in the mammalian olfactory bulb. *Synapse* 7, 181-192 (1991).

Xue, G.P., Calvert, R.A. & Morris, R.J. Expression of the neuronal surface glycoprotein Thy-1 is under post-transcriptional control, and is spatially regulated, in the developing olfactory system. *Development* 109, 851-864 (1990).

Yamaguchi, M. & Mori, K. Critical period for sensory experience-dependent survival of newly generated granule cells in the adult mouse olfactory bulb. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 9697-9702 (2005).

Yang, G., Pan, F., Parkhurst, C.N., Grutzendler, J. & Gan, W.B. Thinned-skull cranial window technique for long-term imaging of the cortex in live mice. *Nat Protoc* 5, 201-208 (2010).

Yang, G., Chang, P.C., Bekker, A., Blanck, T.J. & Gan, W.B. Transient effects of anesthetics on dendritic spines and filopodia in the living mouse cortex. *Anesthesiology* 115, 718-726 (2011).

Yavich, L., Tanila, H., Vepsäläinen, S. & Jäkälä, P. Role of α -synuclein in presynaptic dopamine recruitment. *J. Neurosci.* 24, 11165-11170 (2004).

Yavich, L. et al. Locomotor activity and evoked dopamine release are reduced in mice overexpressing A30P-mutated human α -synuclein. *Neurobiol. Dis.* 20, 303-313 (2005).

Yokoi, M., Mori, K. & Nakanishi, S. Refinement of odor molecule tuning by dendrodendritic synaptic inhibition in the olfactory bulb. *Proc Natl Acad Sci.* 92, 3371-3375 (1995).

Yokojama, T.K. et al. Elimination of adult-born neurons in the olfactory bulb is promoted during the postprandial period. *Neuron* 71, 883-897 (2011).

Yoneyama, M., Shiba, T., Hasebe, S. & Ogita, K. Adult neurogenesis is regulated by endogenous factors produced during neurodegeneration. *J Pharmacol Sci.* 115, 425-432 (2011).

Yuste, R. & Denk, W. Dendritic spines as basic functional units of neuronal integration. *Nature* 375, 682-684 (1995).

Yuste, R. Fluorescence microscopy today. *Nat Methods* 2, 902-904 (2005).

Yuste, R. & Bonhoeffer, T. Morphological changes in dendritic spines associated with long-term synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci.* 24, 1071-1089 (2001).

Zaja-Milatovic, S. et al. Dendritic degeneration in neostriatal medium spiny neurons in Parkinson disease. *Neurology* 64, 545-547 (2005).

Zipfel, W.R., Williams, R.M., Christie, R., Nikitin, A.Y., Hyman, B.T. & Webb, W.W. Live tissue intrinsic emission microscopy using multiphoton-excited native fluorescence and second harmonic generation. *Proc Natl Acad Sci.* 100, 7075-7080 (2003).

Abkürzungen

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
α (β/γ)-SYN	α (β/γ)-Synuklein
A30P	Punktmutation in α-Synuklein
Aβ	Amyloid β
ACSF	Künstliche zerebrospinale Flüssigkeit
ADP	Adenosindiphosphat
ALS	Amyloide Lateralsklerose
AMPA	α-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionische Säure
Anle138b	3-(1,3-benzodioxol-5-yl)-5-(3-bromophenyl)-1H-pyrazole
AOM	Akusto-optischer Modulator
APP	<i>amyloid precursor protein</i>
D-AP5	(2 <i>R</i>)-Amino-5-phosphonopentanoate
As.	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
Az.	Aktenzeichen
BDNF	<i>brain-derived neurotrophic factor</i>
BP	Bandpass
bp	Basenpaare
BrdU	Bromodeoxyuridine
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Kapazität

Abkürzungen

^{14}C	radioaktives Kohlenstoffisotop
Ca^{2+}	Kalzium (-Ionen)
CAG	Hybridkonstrukt aus CMV-Enhancer und β -Aktivpromoter (Huhn)
CAMKII	Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Protein-Kinase II
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CB	Calbindin
CaCl_2	Kalziumchlorid
CCD	ladungsgekoppelte Schaltung
Cl^-	Chloridionen
cm	Zentimeter
CMV	Cytomegalovirus
CO_2	Kohlenstoffdioxid
C_m	Membrankapazität
CR	Calretinin
CREB	Transkriptionsfaktor; <i>cAMP response element binding protein</i>
Cre	engl. <i>causes recombination</i>
crop	engl. für Bildausschnitt
CSP α	Cystein String Protein α
CV	Variationskoeffizient; SD/Mittelwert
CX_3CR_1	Fraktalkin-Rezeptor1
D3cpv	Kalziumsensor
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DCX	Doublecortin
d.h.	das heißt
DIC	Differentialinterferenzkontrast, lichtmikroskopisches Kontrastverfahren
Dlx2	Homöobox-Protein; Transkriptionsfaktor
DNA	Desoxyribonukleinsäure; engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>
dpi	Tage nach Injektion
DTE	Dithioerythrit
E46K	Punktmutation in α -Synuclein
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
eGFP	verbessertes grün fluoreszierendes Protein
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
engl.	englisch für
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	und andere
FGF-2	Fibroblasten-Wachstumsfaktor
fs	Femtosekunden
g	Gramm
G Ω	Gigaohm
GABA	γ -Aminobuttersäure
GAD	Glutamat-Decarboxylase
GcAMP	Kalziumindikator
GFAP	Saures Gliafaserprotein
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GluR1	Glutamatrezeptor 1
Glut	Glutamat
h	Stunden

H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HBSS	Hank's balancierte Salzlösung
HEK293	menschliche embryonale Nierenzellen
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)Ethan-sulfonsäure
Hsc70	Hitzeschockprotein im Chaperonstoffwechsel
I _f Schwellenwert	Schwellenwert zur Induktion von ‚Spikes‘
IHC	Immunhistochemie
i.p.	Intraperitoneal
IRES	Interne ribosomale Eintrittssequenz
I _t	Zeitintervall
IVC	individuell belüfteter Käfig
KA	Kynureinsäure
kb	Kilobasen
KCH ₃ O ₃ S	K-Methylsulfat
KCl	Kaliumchlorid
kD	Kilodalton
kg	Kilogramm
kHz	Kilohertz
Ki-67	Protein zur Markierung von sich teilenden menschlichen Zellen
KO	Knockout
KZ	Körnerzelle
lat.	lateinisch für
LB-Medium	Komplexes Nährmedium für Bakterienkultur
LP	Langpass
LRRK2	Serin/Threoninkinase; <i>Leucin-rich kinase 2</i>
LSM	Laser-scanning Mikroskop
L _{Spine}	Spinelänge
LTD	Langzeit-Depression
LTP	Langzeit-Potentierung
LV	Lentivirus/lentiviral
M	Molar
MAP	Mikrotubuli-assoziiertes Protein
MΩ	Megaohm
mEPSC	erregende postsynaptische Miniaturströme
mg	Milligramm
MgATP	Magnesium-Adenosintriphosphat
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mOsm	Milliosmolar
MP	Multiphoton
MPTP	1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
ms	Millisekunden
MS	Multiple Sklerose
MSA	Multiple Systematrophie
M/TZ	Mitral-/Tufted-Zelle

Abkürzungen

Munc18-1; Munc13-1	<i>mammalian uncoordinated-18/13</i> ; Proteine beteiligt an synaptischer Vesikelfusion
mV	Millivolt
N	Anzahl
Na ⁺	Natriumionen
NAC	<i>non-amyloid component</i>
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NaH ₂ PO ₄	Natriumhydrogenphosphat
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
Nestin	Typ VI Intermediatfilamentprotein
NeuN	Neuronale Nuclei
NeuroD	Transkriptionsfaktor; Nervzelldifferenzierung
NGS	Normales Gänseserum
nl	Nanoliter
nm	Nanometer
NMDA	N-Methy-D-Aspartat
NO	Stickstoffoxid
Notch	Familie von Transmembranproteinen
NSF	N-Ethylmaleimid sensitiver Faktor
O ₂	Sauerstoff
Obj.	Objektiv
6-OHDA	6-Hydroxydopamin
Olig2	Oligodendrozytischer Transkriptionsfaktor
OSN	Olfaktorische Sensorneurone
pA	Picoampere
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGFβ	Wachstumsfaktor; <i>platelet-derived growth factor β</i>
pF	Picofarad
PFA	Paraformaldehyd
PGZ	Periglomeruläre Zelle
Pic; PTX	Picrotoxin
PK	Proteinkinase K
PLK2	<i>Poly-like kinase 2</i>
PLS	Phagosom-Lysosom-System
PMT	Photomultiplier
Proj.	Bildprojektion
PS-1	Presenillin-1
PSD	Postsynaptische Dichte
PV	Parvalbumin
R _{in}	Eingangswiderstand
R _s	Standardwiderstand
RFP	rot fluoreszierendes Protein
RMS	Rostraler migrierender Strom
ROS	Reaktive oxidative Spezies
RT-PCR	<i>Real-time</i> Polymerase-Kettenreaktion
s	Sekunde
S ⁺ /S ⁻	konditionierter/nicht-konditionierter Geruchs-stoff
SD	Standardabweichung

SDS	Natriumdodecylsulfat
Sec1	Transportprotein; Membran-ATPase
SEM	Standardfehler des Mittels
sEPSC	spontane erregende postsynaptische Ströme
Ser129	Serin129
SGT	kleines Glutamin-reiches Protein
SHG	<i>second harmonic generation</i>
SNAP	lösliche NSF Adaptorproteine
SNAP-25	Synaptosomen-assoziiertes 25 kDa Protein
SNARE	SNAP-Rezeptor
SOX2	Stammzellmarker (undifferenzierte Zellen)
span.	spanisch für
SPF	spezifiziert pathogenfrei
SVZ	Subventrikuläre Zone
T	Temperatur
t	Zeit
tdTomato	rot fluoreszierendes Protein
Tet	Tetracyclin
TH	Tyrosinhydroxylase
Thy1	Thymocytantigen 1; CD90
TOR	Umsatzrate; <i>turnover rate</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U/min	Umdrehung pro Minute
UPS	Ubiquitin-Protease-Systems
UV	Licht im ultravioletten Bereich
VACC	spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle
VAMP2	Vesikel-assoziiertes Membranprotein 2
VGAT	vesikulärer GABA Transporter
W_{Kopf}	Breite des Spinekopfes
W_{Hals}	Breite des Spinehalses
XFP	X (Farbvariable) fluoreszierendes Protein
YFP	gelb fluoreszierendes Protein
z.B.	zum Beispiel
ZF	Zentrifugalfasern
ZP	Zentripetalfasern
ZNS	Zentralnervensystem

Eigene Veröffentlichungen

Caruana, M.*, **Neuner, J.***, Högen, T., Schmidt, F., Kamp, F., Scerri, C., Giese, A. & Vassallo, N. Polyphenolic compounds are novel protective agents against lipid membrane damage by α -synuclein aggregates *in vitro*. *Biochim Biophys Acta* **1818**, 2502-2510 (2012). (*geteilte Erstautorenschaft)

Neuner, J., Filser, S., Michalakis, S., Biel, M. & Herms, J. A30P α -Synuclein interferes with the stable integration of adult-born neurons into the olfactory network. *Sci Rep.* **3931**, 1-9 (2014).

Neuner, J., Ovsepiyan, S.V., Dorostkar, M., Filser, S., Gupta, A., Michalakis, S., Biel, M. & Herms, J. Pathological α -synuclein impairs adult-born granule cell development and functional integration in the olfactory bulb. *Nat Commun.* **3915**, 1-12 (2014).

Poster

Neuner, J., Filser, S. & Herms, J. *In vivo* two-photon investigation of the dopaminergic neuron turnover in mouse models of Parkinson disease - 100 years of Lewy bodies Meeting, München, Deutschland (2012).

Neuner, J., Filser, S. & Herms, J. *In vivo* imaging of the neuronal plasticity in mouse models of Parkinson disease - Neuroscience Meeting, New Orleans, USA (2012).

Neuner, J., Filser, S. & Herms, J. Long-term *in vivo* imaging of the integration, maturation and the survival of adult-born neurons in the olfactory bulb of transgenic animal models of Parkinson disease - ERANet Neuron Meeting, Dead Sea, Israel (2013).

Neuner, J., Ovsepiyan, S.V., Dorostkar, M. & Herms, J. Disturbed development and stability of dendritic spines of adult-born olfactory bulb neurons in A30P α -synuclein mice - Neuroscience Meeting, San Diego, USA (2013).

Neuner, J., Ovsepiyan, S.V., Dorostkar, M. & Herms, J. A30P α -SYN interferes with the synaptic plasticity and integration of adult-born neurons in the olfactory bulb - Neuropharmacology Conference, San Diego, USA (2013).

Vorträge

Neuner, J. *In vivo* investigation of the maturation and integration of adult-born neurons in the Parkinson disease olfactory bulb - ForNeuroCell Meeting, Schloss Nymphenburg München, Deutschland (2012).

Neuner, J. *In vivo* two-photon imaging of the maturation and integration of adult-born neurons in the olfactory bulb of Parkinson model mice - ERANet Neuron Meeting, Pasteur Institute Paris, Frankreich (2012).

Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei Prof. Jochen Herms bedanken, der mir mit dem spannenden Thema, seinem entgegengebrachten Vertrauen und seiner stetigen Unterstützung diese Doktorarbeit in einem ausgezeichneten wissenschaftlichen Umfeld ermöglicht hat. Besonderen Dank auch für die internationalen Konferenzteilnahmen, die mir die Neurowissenschaften auf eine schöne Art und Weise näher gebracht haben.

Ein weiteres herzliches Dankeschön an Prof. George Boyan, der die Vertretung dieser Dissertation vor der Fakultät für Biologie so bereitwillig übernommen hat.

Danke auch an Prof. Hans Kretzschmar für die hervorragenden Arbeitsbedingungen am Zentrum für Neuropathologie.

Bei allen Zweitprüfern möchte ich mich für Ihre Mühe und Arbeit bei der Begutachtung meiner Arbeit bedanken.

Während meiner Doktorarbeit habe ich mit vielen Wissenschaftlern zusammengearbeitet. Hierbei möchte ich vor allem Severin Filser nennen, mit dem ich gemeinsam die komplizierte Intravitalmikroskopie des Riechkolbens etabliert habe. Für den regelmäßigen konstruktiven Austausch möchte ich mich herzlich bedanken. Dr. Saak Ovsepian danke ich sehr für die elektrophysiologischen Messungen. Danke auch an Dr. Mario Dorostkar, der mir in statistischen Fragen stets zur Seite stand, und an meinen Masterstudenten Aayush Gupta. Bei Dr. Neville Vassallo möchte ich mich herzlich für seine einwandfreien Manuskriptkorrekturen bedanken. Zusätzlich möchte ich mich bei Dr. Lisa Glasl, Dr. Chichung Lie, Dr. Stelios Michalakis, Prof. Martin Biel, Dr. Thomas Arzberger, Prof. Adi Mizrahi, Prof. Pierre-Marie Lledo und Prof. Jacek Jarowski für die erfolgreichen Kollaborationen bedanken. Ein weiteres Dankeschön geht an Prof. Armin Giese für das Ermöglichen der Therapiestudie.

Für das hervorragende Klima im Laboralltag möchte ich Christian, Kevin, Suvi, Nadine, Bine, Felix, Markus, Julia, Sonja B. und allen weiteren Kollegen der AG Herms und des ZNP danken. Speziellen Dank auch an Sonja S., Eric und den Tierstall für die tatkräftige Unterstützung.

Ein großes und liebes Dankeschön an meine Eltern, Felix und beide Omis, die mich immer wieder ermutigt haben und mir gerade an den zähen Tagen des Doktorandenlebens eine Stütze waren. Euch möchte ich diese Arbeit widmen.

Mein besonderes, letztes Danke geht an meinen lieben Steffen.